



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### ***HAEMOPHILUS INFLUENZAE* NÃO TIPÁVEL- ESTADO DA ARTE**

Trabalho submetido por  
**Sara Raquel Costa Cavaco Kittler Coelho**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Outubro de 2015**



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### ***HAEMOPHILUS INFLUENZAE NÃO TIPÁVEL- ESTADO DA ARTE***

Trabalho submetido por  
**Sara Raquel Costa Cavaco Kittler Coelho**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Patrícia Cavaco Silva**

**Outubro de 2015**



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos aqueles que sempre me incentivaram durante o meu percurso académico e que sempre me fizeram perceber que eu era capaz!

*“ A persistência é o caminho do êxito”*

Charles Chaplin



## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho apresentou um enorme desafio para mim, o qual estou certa que me fez crescer não só a nível académico, bem como a nível pessoal. Contudo, nunca o poderia ter superado sem a ajuda e apoio que tive a felicidade de ter.

Devo um enorme agradecimento à Prof. Doutora Patrícia Cavaco Silva, por toda a ajuda, paciência, dedicação, empenho e conhecimento transmitido ao longo deste projeto. Mesmo quando me deparei com as dificuldades inerentes ao trabalho, estive presente e juntas tentamos ultrapassar as adversidades. Muito obrigada.

Aos meus pais, Joaquim e Paula, à minha avó Arminda e à minha irmã Rute, vocês são o motivo pelo qual tenho força todos os dias para encarar os desafios que a vida me proporciona e estou eternamente grata pelas oportunidades que me proporcionaram ao longo da minha vida académica. Só com o vosso amor foi possível chegar até aqui. A todos, muito obrigada.

Ao Tiago, pelo companheirismo, coragem e amor transmitidos ao longo de todos estes anos. Obrigada por estares sempre do meu lado.

À Rita por ser a minha parceira e amiga desde o primeiro dia. Juntas vivemos este percurso académico intensamente. Obrigada por teres feito esta caminhada sempre de “mãos dadas” comigo.

Não posso deixar de agradecer também a todas as amigas, em especial às que sempre me acompanharam e encorajaram desde o início Rita Pinto e Sara Afonso, bem como aquelas que apareceram na reta final Filipa Cantiga, Isabel Silva e Ana Beatriz Guerreiro.

Agradeço também a todos os colegas e professores que se cruzaram no meu caminho ao longo destes 5 anos, assim como não poderei terminar sem agradecer à Dra. Filipa Monte e à Dra. Helena Farinha por me terem recebido enquanto estagiária e por terem contribuído para que me tornasse numa farmacêutica mais competente e autónoma. Obrigada por tudo.

A vida é um desafio vivido com os olhos postos no futuro, por isso agradeço a todos os que contribuíram para que aquilo que parecia um futuro longínquo se tornasse num presente muito feliz.

A todos, um enorme e sincero agradecimento.



## **RESUMO**

Ao longo dos últimos anos, tem-se verificado um aumento significativo de infecções provocadas por bactérias da espécie *Haemophilus influenzae*, sobretudo *Haemophilus influenzae* não tipável (NTHi).

NTHi trata-se de um pequeno cocobacilo de Gram-negativo, não capsulado exclusivo dos seres humanos, comensal, do trato respiratório superior, e que ultimamente tem assumido um papel muito importante como agente patogénico.

Esta bactéria é uma das causas mais comuns de infecções do trato respiratório superior e inferior, provocadas em crianças e adultos, tais como: sinusite bacteriana, conjuntivite bacteriana, otite média aguda (OMA), pneumonia adquirida na comunidade (PAC) e exacerbações na doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC). Por outro lado, em situações mais pontuais, NTHi é também capaz de provocar infecções invasivas como meningite e septicémia.

No sentido de aprofundar melhor a patogénese de NTHi, uma vez que a mesma ainda não está bem esclarecida, a presente monografia, realizada no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, apresentou como principal objetivo a realização de um levantamento dos conhecimentos adquiridos acerca de NTHi nos últimos 10 anos e compreender de que forma as descobertas científicas obtidas contribuíram para a compreensão deste agente patogénico e a melhoria da saúde pública, nomeadamente ao nível da prevenção através da vacinação.

Desta forma, através dos dados recolhidos foi possível constatar que NTHi apresentou maior incidência de infecções desde a introdução de uma vacina polissacarídea conjugada contra *H. influenzae* tipo b e que atualmente é urgente a necessidade de criação de uma vacina contra NTHi, sobretudo para prevenção de doenças invasivas.

**Palavras-chave:** *Haemophilus influenzae* não tipável, epidemiologia, clínica, patogénese, vacinação





## **ABSTRACT**

Over the past few years, there has been a significant increase in infections caused by bacteria of the species *Haemophilus influenzae*, particularly non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi).

NTHi, is an exclusive human, small Gram-negative coccobacillus, non capsulated, normally found in the upper respiratory tract, and that lately has played a very important role as a pathogen.

This bacteria is one of the most common causes of upper and lower respiratory tract infections, in children and adults, such as bacterial sinusitis, bacterial conjunctivitis, acute otitis media (AOM), community-acquired pneumonia (CAP) and acute exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Moreover, in more specific situations, NTHi is also capable of causing invasive infections such as meningitis and septicemia.

In order to better understand the pathogenesis of NTHi, since it's not yet fully well known, the present monograph, held under the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences, presented the main purpose of conducting a survey of the knowledge acquired about NTHi in the last 10 years and understand how the relevant scientific discoveries contributed to the understanding of this pathogen and improvement of public health, particularly in terms of prevention through vaccination.

In this way, through the collected data it was established that NTHi had a higher incidence of infections since the introduction of a polysaccharide conjugate vaccine against *H. influenzae* type b and that there now is an urgent need to create a vaccine against NTHi, especially for the prevention of invasive disease.

**Keywords:** non-typeable *Haemophilus influenzae*, epidemiology, clinic, pathogenesis, vaccination



## **ÍNDICE GERAL**

DEDICATÓRIA.....	3
AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	15
ÍNDICE DE TABELAS.....	17
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	19
<b>I- Preâmbulo.....</b>	<b>21</b>
<b>II- Introdução.....</b>	<b>23</b>
1. Perspectiva histórica.....	23
2. Taxonomia.....	24
2.1 Família <i>Pasteurellaceae</i> .....	24
2.2 Género <i>Haemophilus influenzae</i> .....	25
2.2.1 Serotipagem.....	27
<b>III- Estado da arte.....</b>	<b>29</b>
1. Microbiologia.....	29
2. Clínica.....	30
2.1 Doenças não invasivas.....	30
A. Infecções do trato respiratório superior.....	30
i. Sinusite bacteriana.....	30
ii. Conjuntivite bacteriana.....	31
iii. Otite média aguda.....	31
B. Infecções do trato respiratório inferior.....	32
i. Pneumonia adquirida na comunidade.....	32
ii. Exacerbações na Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica.....	32
iii. Fibrose quística.....	33

C. Infecções do trato genital feminino .....	33
2.2 Doenças invasivas.....	34
3. Fatores de virulência.....	37
3.1 Adesinas.....	37
i. Fímbrias ou pílís.....	37
3.2 Proteínas auto-transportadoras.....	38
i. HMW1 e HMW2.....	38
ii. Proteína Hap.....	39
3.3 Protease IgA.....	39
3.4 Proteína D.....	40
3.5 Lipooligossacárido.....	41
3.6 Proteínas de membrana externa.....	41
i. Proteína de membrana externa P2.....	41
ii. Proteína de membrana externa P5.....	42
iii. Proteína de membrana externa P6.....	42
3.7 Biofilme.....	43
4. Epidemiologia.....	46
4.1 Epidemiologia Mundial e na Europa.....	47
4.2 Epidemiologia em Portugal.....	50
5. Imunidade.....	51
5.1 Defesa estrutural das vias aéreas.....	52
5.2 Imunidade inata.....	52
5.2.1 Sistema do complemento.....	53
5.2.2 Resposta imunitária celular.....	55
5.3 Imunidade adquirida.....	55
5.3.1 Imunidade humoral.....	56
5.3.2 Imunidade mediada por células.....	56
6. Fatores de risco.....	57
6.1 Tabagismo.....	57
6.2 Infecções virais.....	58
7. Tratamento.....	58
7.1 Mecanismos de resistência antimicrobiana.....	58
7.2 Terapêutica antibiótica.....	60
i. Sinusite bacteriana.....	60

ii.	Conjuntivite bacteriana.....	61
iii.	Otite média aguda.....	61
iv.	Pneumonia adquirida na comunidade.....	62
v.	Exacerbações na DPOC.....	64
vi.	Infeções invasivas.....	64
8.	Prevenção.....	65
8.1	Vacinação.....	65
<b>IV-</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>67</b>
	Bibliografia.....	69



## **ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1-** *Haemophilus influenzae* (cocobacilos) observados em esfregaço com coloração de Gram

**Figura 2-** Distribuição da incidência de infecções invasivas causadas por NTHi de acordo com a idade dos indivíduos

**Figura 3-** Figura representativa de fímbrias de *Haemophilus influenzae*

**Figura 4-** Etapas de formação e desenvolvimento de um biofilme

**Figura 5-** Imagem de biofilme de *Haemophilus influenzae* não tipável com recurso a microscopia eletrónica

**Figura 6-** Número de NTHi isolados de indivíduos com infeção invasiva entre 1992-2013

**Figura 7-** Casos de doença invasivas causadas por *H. influenzae* segundo a idade e o género

**Figura 8-** Percentagem de cada serotipo de *Haemophilus influenzae* entre 1996-2004

**Figura 9-** Casos reportados de doenças invasivas causadas por *H. influenzae* por ano e serotipo na EU/AEE

**Figura 10-** Distribuição dos serotipos de 144 doentes com infeção invasiva a *H. influenzae* entre 2002 e 2010

**Figura 11-** Sistema do complemento e respetivas vias de atuação

**Figura 12-** Quadro resumo acerca dos antibióticos utilizados no tratamento da OMA segundo as normas da DGS

**Figura 13-** Quadro resumo acerca dos antibióticos utilizados no tratamento da PAC segundo as normas da DGS





## **ÍNDICE DE TABELAS**

**Tabela 1-** Microrganismos importantes da família *Pasteurellaceae* e respetiva origem histórica

**Tabela 2-** Doenças predominantes causadas por NTHi e respetiva incidência

**Tabela 3-** Casos de doenças invasivas causadas por *Haemophilus influenzae* desde a introdução de uma vacina polissacarídea conjugada contra *H. influenzae* tipo b

**Tabela 4-** Casos de infeções causadas por Hib e NTHi, de acordo com a faixa etária no ano de 2012 em vários estados dos EUA (Califórnia, Colorado, Connecticut, Georgia; Maryland, Minesota, Novo México, Nova York, Oregon e Tennessee)

**Tabela 5-** Situações que justificam a associação de amoxicilina com ácido clavulânico em detrimento do uso exclusivo de amoxicilina



## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

**BLNAR-** não produtora  $\beta$ -lactamase ampicilina resistentes

**BLNAS-** não produtora  $\beta$ -lactamase ampicilina suscetíveis

**BLPACR-** produtora  $\beta$ -lactamase ampicilina ácido clavulânico resistente

**DGS-** direção geral de saúde

**DPOC-** doença pulmonar obstrutiva crónica

**Hib-** *Haemophilus influenzae* tipo b

**LOS-** lipooligossacárido

**LPS-** lipopolissacárido

**NTHi-** *Haemophilus influenzae* não tipável

**OMA-** otite média aguda

**PAC-** pneumonia adquirida na comunidade

**PLP-** proteína de ligação à penicilina

**PME-** proteína de membrana externa

**TLR-** recetores *Toll-like*



## **I. PREÂMBULO**

Ao longo dos últimos anos, a bactéria *Haemophilus influenzae* não tipável (NTHi) tem assumido um papel muito importante como agente patogénico, uma vez que é uma das causas mais comuns de infeções provocadas em crianças e adultos, sobretudo adultos com doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) (Farshid & Riesbeck, 2014; Van Eldere, Slack, Ladhani, & Cripps, 2014).

Nesse sentido, a escolha deste tema está fortemente relacionada com os motivos supracitados, bem como com o facto de a patogénese molecular de NTHi ainda não estar bem esclarecida (Farshid & Riesbeck, 2014).

Deste modo, no decorrer da presente monografia o principal objetivo focou-se em realizar um levantamento dos conhecimentos adquiridos acerca deste microrganismo nos últimos 10 anos e compreender de que forma as descobertas científicas obtidas contribuíram para a melhoria da saúde pública, nomeadamente ao nível da prevenção através da vacinação.



## II. INTRODUÇÃO

### 1. Perspetiva histórica

As espécies pertencentes ao género *Haemophilus* foram inicialmente descritas por Robert Koch, mas a descoberta da bactéria *Haemophilus influenzae* foi conferida aos bacteriologistas e físicos Richard Pfeiffer e Shibasaburo Kitasato. (Taubenberger, Hultin, & Morens, 2007)

Pfeiffer examinou amostras de secreções brônquicas de indivíduos que morreram durante a pandemia da gripe de 1918, e observou nas mesmas, a existência de um grande número de pequenos bacilos que tinham a singularidade de necessitar de um meio enriquecido em sangue para um crescimento favorável. Richard Pfeiffer designou estes organismos por "*Bacillus influenzae*", e considerou-os, nessa altura, como os agentes primários causadores da doença da gripe. (Schuchat & Messonnier, 2007)

Anos mais tarde, o vírus humano da gripe foi descoberto e identificado como o agente etiológico da gripe, o que colocou em dúvida a importância de *H. influenzae* na pandemia da gripe. Contudo, verificou-se que este poderia ter contribuído grandemente para a elevada taxa de mortalidade durante a pandemia, precisamente pelo fato de estar associada a infeções bacterianas secundárias. (Taubenberger et al., 2007)



**Tabela 1-** Microrganismos importantes da família *Pasteurellaceae* e respetiva origem histórica.

Adaptado de, Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2014

Microrganismo	Origem histórica
<i>Haemophilus</i>	Haemo, sangue; Hilo, amor (“ ama o sangue”; requer sangue para crescimento em meio de agar)
<i>H. influenzae</i>	Originalmente considerado a 1ª causa de Influenzae (Gripe)
<i>H. aegyptius</i>	Aegyptius, egípcio (observado em 1883, por Robert Kock, em exsudados de egípcios com conjuntivite)
<i>H. ducreyi</i>	Microrganismo isolado pela primeira vez pelo bacteriologista Ducrey, tendo sido o nome atribuído em sua homenagem
<i>Actinobacillus</i>	Actinis, raio; bacilo, pequena haste (“Bacilo raio”- relacionado com o crescimento de formas filamentosas)
<i>Aggregatibacter</i>	Aggregare, união; bacter, haste bacteriana; bactéria em forma de bastonete agregado
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Comitans, acompanhar (“acompanha um actinomiceto”)
<i>A. aphrophilus</i>	Aphros, espumas; philos, amoroso
<i>Pasteurella</i>	Nome em homenagem a Louis Pasteur
<i>P. multocida</i>	Multus, muitos; cidus, matar (“mata muitos”; patogénico para muitas espécies animais)
<i>P. canis</i>	Canis, cão (isolado da boca do cão)

## 2. Taxonomia

A nível taxonómico, a bactéria *H. influenzae* pertence ao filo *Proteobacteria*, à classe *Gammaproteobacteria*, à ordem *Pasteurellales*, à família *Pasteurellaceae*, ao género *Haemophilus* e à espécie *influenzae*.

De entre as espécies adaptadas ao ser humano, para além de *H. influenzae*, destacam-se *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus*, *H. influenzae* biotipo *aegyptius*, *H. ducreyi*, *H. segnis*, *H. aphrophilus* e *H. paraphrophilus* (Gillespie & Hawkey, 2006).

### 2.1 Família *Pasteurellaceae*

A família *Pasteurellaceae* é composta por 65 espécies, as quais se encontram distribuídas em 19 géneros sendo que os quatro principais géneros são *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, e *Mannheimia* (Bonaventura, Lee, DeSalle, & Planet, 2010; Naushad et al., 2015).

Algumas espécies desta família são agentes comensais do trato respiratório superior, bem como da cavidade oral, podendo, contudo, tornarem-se patogénicos. É neste contexto que se dá maior ênfase ao microrganismo *H. influenzae* não tipável, na medida em que o mesmo está presente no trato respiratório de muitos indivíduos, sendo que poderá tornar-se patogénico quando se verifica uma supressão ao nível do sistema imunitário (Bonaventura et al., 2010).

O género *Haemophilus* contém espécies responsáveis por uma diversidade de patologias como é o caso de pneumonia, meningite bacteriana aguda e cancro mole (que se trata de uma doença sexualmente transmissível). Por outro lado, espécies dos géneros *Mannheimia*, *Pasteurella* e *Actinobacillus* podem estar na base da etiologia da febre de transporte de bovinos, cólera aviária e pleuropneumonia em suínos, respetivamente (Naushad et al., 2015).

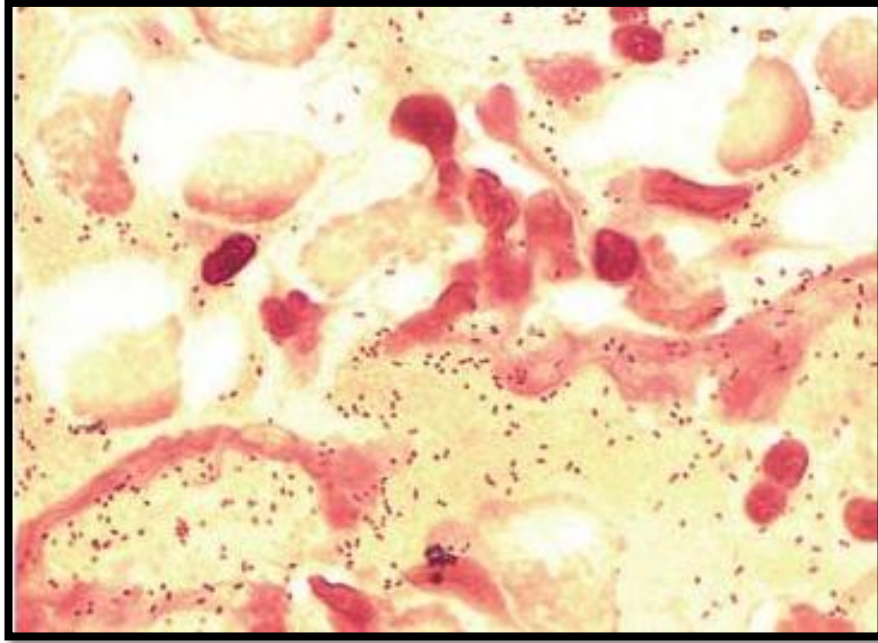
## 2.2 Género *Haemophilus influenzae*

*H. influenzae* trata-se de um pequeno cocobacilo de Gram-negativo, comensal, do trato respiratório superior, mais propriamente da nasofaringe, bastante fastidioso e que necessita de fator X (hemina) e fator V (dinucleótido de nicotinamida adenina-NAD) para o seu crescimento, sendo a sua temperatura ótima de crescimento entre os 35 e os 37°C (Foxwell, Kyd, & Cripps, 1998; Paul T. King & Sharma, 2015).

A hemina poderá auxiliar como fonte de ferro e protoporfirina e é utilizada, opcionalmente, para o crescimento sob condições anaeróbicas. Por outro lado, NAD é utilizado nos processos de oxidação-redução do metabolismo celular da bactéria (Reidl et al., 2000).

A parede celular de *H. influenzae* apresenta uma estrutura típica das bactérias de Gram-negativo, sendo constituída por uma camada de peptidoglicano, que é responsável pela forma mais rígida das células e pela proteção do citoplasma contra às diferenças na pressão osmótica, bem como três outros componentes que a envolvem externamente: lipoproteínas, cuja função é estabilizarem a membrana externa e fixá-la à camada de peptidoglicano; membrana externa, responsável pela prevenção da perda de proteínas periplasmáticas (específicas de cada estirpe) e evitar o acesso de enzimas hidrolíticas e de certos antibióticos ao peptidoglicano, e por último lipooligossacárido (LOS), que

apresenta a função de endotoxina (Choi, Cox, Li, McCready, & Ulanova, 2014; Murray et al., 2014).



**Figura 1-** *Haemophilus influenzae* (cocobacilos) observados em esfregaço com coloração de Gram. Retirado de, Murray et al., 2014

Este microrganismo tem sido vastamente utilizado como microrganismo modelo, a partir do qual têm surgido algumas conquistas científicas ao longo da história (Farshid & Riesbeck, 2014).

Entre estas, destaca-se o facto de *H. influenzae* ter sido utilizado como fonte de isolamento da primeira enzima de restrição; ter sido utilizado para desenvolver o primeiro modelo animal ao nível da meningite bacteriana, e por último, por se tratar do primeiro organismo vivo a ter o seu genoma completamente sequenciado (Farshid & Riesbeck, 2014).

### 2.2.1 Serotipagem

As espécies desta bactéria são comumente divididas em dois grupos distintos, derivando da presença ou ausência de cápsula polissacarídea (Puig et al., 2013). A cápsula tem a finalidade de evitar a opsonização e a fagocitose por parte dos neutrófilos (Rahman, 2009).

Assim sendo, sabe-se que a maioria das estirpes desta espécie é capsulada, o que as torna menos vulneráveis aos mecanismos naturais de defesa do hospedeiro, e podem dividir-se em seis serotipos tendo por base a sua capsula polissacarídea, os quais se podem classificar de A a F (Van Eldere et al., 2014). Estes podem ser identificados por métodos serológicos, ou seja, por testes de aglutinação por meio de antissoros específicos para cada serotipo capsular, e/ou por técnicas moleculares através da detecção do gene específico para cada tipo capsular com recurso à reação de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Puig et al., 2013).

Por outro lado, quando *H. influenzae* é não-capsulado, não é possível efetuar qualquer tipo de serotipagem, passando a denominar-se *H. influenzae* não tipável- NTHi (Puig et al., 2013).

De entre as estirpes tipáveis, destaca-se *H. influenzae* tipo b (Hib), por se tratar do serotipo mais conhecido, mais estudado e mais patogénico (Paul T. King & Sharma, 2015).

Este, ao contrário do que acontece com as estirpes não tipáveis, está fortemente relacionado com o aparecimento de doenças invasivas, tal como meningites, principalmente em crianças (De Chiara et al., 2014).

Anteriormente à introdução da vacina conjugada contra *H. influenzae* tipo b, este serotipo era a causa de mais de 95% das infeções invasivas causadas pelo género *Haemophilus* (Murray et al., 2014), uma vez que é considerado o serotipo mais virulento (Choi et al., 2014).

Por outro lado, desde a introdução da vacina conjugada contra *H. influenzae* tipo b, há mais de 20 anos atrás (Van Eldere et al., 2014), tem-se observado um decréscimo ao nível das infeções provocadas pelo mesmo (Puig et al., 2013), o que se apresenta como algo bastante positivo na medida em que permite prevenir doenças provocadas por este microrganismo, uma vez que se tem conhecimento de que antes da introdução

da mesma, este serotipo era a causa major de infeções em recém-nascidos e crianças (Puig et al., 2014).

Neste sentido, posteriormente à introdução da vacina, a maioria das patologias atualmente são provocadas por estirpes de NTHi (Murray et al., 2014). Tal fica a dever-se ao facto de a vacina conjugada contra Hib não prevenir infeções contra NTHi (Choi et al., 2014).

### III. ESTADO DA ARTE

#### ***Haemophilus influenzae* não tipável**

##### **1. Microbiologia**

NTHi, tal como já mencionado anteriormente, trata-se de uma estirpe de *H. influenzae* que não possui cápsula e que integra a flora microbiana da nasofaringe.

Embora se trate de um comensal da nasofaringe em indivíduos saudáveis, este mesmo microrganismo apresenta patogenicidade aquando da sua presença no trato respiratório superior e inferior, sendo um importante agente patogénico da mucosa respiratória (Paul T. King & Sharma, 2015).

Nesse sentido, e embora NTHi nunca tenha tido um perfil de incidência tão elevado de infeções em comparação com *H. influenzae* tipo b e *S. pneumoniae* (Van Eldere et al., 2014), este pode estar envolvido em infeções como sinusite, conjuntivite e pneumonia adquirida na comunidade (PAC), e em casos raros pode provocar doenças mais severas como septicémia ou meningite. Em situações pontuais poderá também estar presente no trato genital feminino (Gilsdorf, McCrea, & Marrs, 1997; Langereis, de Jonge, & Weiser, 2014; Puig et al., 2013).

NTHi é também o microrganismo mais frequentemente encontrado em pulmões de indivíduos com exacerbações de doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e é ainda, a segunda causa mais comum de otite média bacteriana a seguir a *S. pneumoniae* (Rosadini, Ram, & Akerleya, 2014).

Contudo, ao invés do que se observa com *H. influenzae* tipo b, NTHi é invulgarmente associado a doenças invasivas (Rosadini et al., 2014), uma vez que é considerado um agente patogénico extracelular, apesar de durante várias décadas alguns estudos terem relatado números significativos de NTHi numa variedade de células epiteliais respiratórias humanas, células sub-epiteliais e macrófagos, tanto *in-vitro* como *ex-vivo* (Clementi, Håkansson, & Murphy, 2014).

Ainda assim, desde a introdução da vacina conjugada contra *H. influenzae* tipo b, observou-se o aparecimento de algumas infeções invasivas causadas por

*Haemophilus influenzae* não tipável, como é possível observar na tabela 2. Deste modo, as doenças invasivas causadas por NTHi afetam indivíduos suscetíveis, tais como crianças prematuras, idosos, imunodeprimidos, indivíduos com algum tipo de doença maligna, ou portadores de doenças crônicas cardiovasculares e respiratórias (Van Eldere et al., 2014).

**Tabela 2-** Doenças predominantes causadas por NTHi e respetiva incidência. Adaptado de, Van Eldere et al., 2014

Incidência	
Doenças não- invasivas	
Otite média	55-95% dos casos em crianças
Conjuntivite bacteriana	44-68% dos casos em crianças; 25% dos casos em adultos
Sinusite bacteriana	41% dos casos em crianças
Exacerbações na DPOC	> 90% durante uma exacerbação aguda
Bronquite bacteriana persistente	81% dos casos em crianças
Fibrose quística	Até 30% de amostras de expetoração
Infeções do trato respiratório inferior	20-94% dos casos associados a PAC; 15-40% dos casos associados a pneumonia; 2-10% dos casos associados a pneumonia bacteriana
Doenças invasivas	
Infeções neonatais (Septicémia e Meningite)	1,6- 4,9 por 100 nados vivos

## 2. Clínica

### 2.1 Doenças não invasivas

#### A. Infeções do trato respiratório superior

##### i. Sinusite bacteriana

A sinusite bacteriana é uma infeção do trato respiratório superior bastante frequente, sendo a quinta causa mais comum para a prescrição de antibióticos nos Estados Unidos da América (EUA). Os sintomas tendem a aparecer durante a infância, contudo esta patologia pode afetar crianças e adultos.

Esta infecção é vulgarmente causada por *S. pneumoniae* e por várias estirpes do género *Haemophilus*, porém a introdução da vacina Prevenar®, dirigida contra vários serotipos de pneumococos, levou a um aumento da colonização da nasofaringe por NTHi passando a verificar-se um aumento do aparecimento de sinusite bacteriana causada pelo mesmo (Van Eldere et al., 2014).

## **ii. Conjuntivite bacteriana**

A conjuntivite bacteriana trata-se de um tipo de infecção que afeta sobretudo criança, cujos principais sintomas se caracterizam pelo aparecimento de prurido, irritação, sensação de corpo estranha, olhos lacrimejantes e aparecimento de secreções purulentas (Epling, 2012).

NTHi provoca 44-68% das conjuntivites bacterianas em crianças enquanto que em adultos apenas provocam 25% da referida infecção. As percentagens apresentadas estão relacionadas, também, com o facto de em adultos as conjuntivites serem sobretudo virais e não bacterianas (Van Eldere et al., 2014).

## **iii. Otite média aguda (OMA)**

A otite média bacteriana, trata-se de uma infecção do ouvido que afeta mais de 75% das crianças com idade inferior a 3 anos (Van Eldere et al., 2014).

Entre outros microrganismos, NTHi é encontrado no ouvido médio numa percentagem de 55-95%, a qual varia de acordo com a região geográfica. Verifica-se maior prevalência do mesmo em crianças que apresentaram insucesso a terapias antimicrobianas, indivíduos com otite média bilateral e em indivíduos com otite média aguda recorrente (Van Eldere et al., 2014).

Tal como supracitado, existem diversos patogénicos capazes de causar otite bacteriana e nesse sentido é bastante usual a administração de uma vacina pneumocócica conjugada a fim de prevenir otites causadas pela bactéria *pneumococo*. Assim sendo, após a introdução da vacina Prevenar®, NTHi passou a integrar a lista das bactérias mais vulgarmente envolvidas em otites (Mizrahi et al., 2014).

No sentido de compreender a resistência de NTHi aos antibióticos, bem como a sua elevada patogenicidade, vários estudos sugerem, que NTHi está inserido em biofilmes. Biofilmes tratam-se de uma comunidade de microrganismos que a aderem à



superfície celular e que se encontram envoltos numa matriz extracelular que os próprios produzem. Desta forma, torna-se mais complicado a resposta do sistema imunitário do hospedeiro, assim como a resposta à terapêutica antibiótica (Mizrahi et al., 2014).

## **B. Infecções do trato respiratório inferior**

### **i. Pneumonia adquirida na Comunidade (PAC)**

A pneumonia caracteriza-se por uma infecção respiratória aguda associada ao aparecimento de uma mancha segmentar, lobar ou multilobar no exame radiológico, cuja prevalência é cerca de cinco vezes superior em países em vias de desenvolvimento (Akter, Shamsuzzaman, & Jahan, 2014).

A PAC define-se como uma infecção aguda do parênquima pulmonar que afeta frequentemente indivíduos hospitalizados, caracterizando-se pela presença de sinais de respiração alterada (Puig et al., 2013).

*H. influenzae* é considerado a segunda causa mais comum de PAC em adultos, a seguir a *S. pneumonia* (Puig et al., 2013).

### **ii. Exacerbações na Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC)**

A doença pulmonar obstrutiva crónica, caracteriza-se por uma limitação do fluxo aéreo progressivo e, geralmente, irreversível. Para além destes aspetos, verifica-se também na DPOC uma redução da área de superfície dos pulmões o que afeta a elasticidade pulmonar, bem como as trocas gasosas (Ganesan et al., 2014).

Ao invés do que se observa nas vias aéreas de indivíduos com pulmões saudáveis, indivíduos com DPOC clinicamente estáveis podem apresentar entre 25 a 50% de microrganismos patogénicos respiratórios (Agrawal & Murphy, 2011).

Sabe-se ainda que 50% das exacerbações estão associadas a causas bacterianas e que *H. influenzae* é a causa bacteriana mais comum das mesmas. É possível inclusive compreender que a presença de NTHi em amostras de exsudado brônquico manifesta um aumento de 33% em doentes com DPOC estável para 87% em doentes com exacerbações (Agrawal & Murphy, 2011; Van Eldere et al., 2014).

Nesse sentido, e por forma a sustentar o supracitado, é de realçar que NTHi é o microrganismo mais frequentemente isolado a partir das vias respiratórias inferiores dos adultos com exacerbações da DPOC e que aquando da sua presença se verifica um aumento da inflamação das vias aéreas, o que se trata de uma característica específica das exacerbações na DPOC (Agrawal & Murphy, 2011; Rosadini et al., 2014).

Desta forma, compreende-se que a colonização do trato respiratório inferior por NTHi é a maior causa de inflamação das vias aéreas, assim como de danos teciduais.

### **iii. Fibrose quística**

*H. influenzae* não tipável é comumente isolado de amostras de expectoração de indivíduos com fibrose quística e também frequentemente encontrado em biofilmes das vias respiratórias de crianças com a mesma patologia.

Desta forma, quando NTHi se torna patogénico, apresenta grande facilidade em provocar lesões pulmonares o que possibilita iniciar os processos inflamatórios que permitem a colonização e consequente infeção por *Pseudomonas aeruginosa* (Agrawal & Murphy, 2011; Van Eldere et al., 2014).

Este facto é sustentado por estudos que evidenciam a presença de NTHi em biofilmes no epitélio das vias aéreas, que manifestam um aumento da resistência antimicrobiana (Van Eldere et al., 2014).

### **C. Infeções do trato genital feminino**

Apesar da escassa informação acerca deste tipo de infeção, sabe-se que NTHi está presente no trato genital feminino em situações pontuais.

É relevante referir que *H. influenzae* foi descrito pela primeira vez, enquanto causador de uma pielonefrite devido a cálculos renais, por James Homer Wright no ano de 1905.

De entre as infeções causadas por este microrganismo, destacam-se as infeções urinárias e a endometrite, sobretudo em indivíduos que apresentam patologias ao nível

do trato genital. Esta observação pode ser justificada com o facto de a urina ser altamente bactericida para *H. influenzae*.

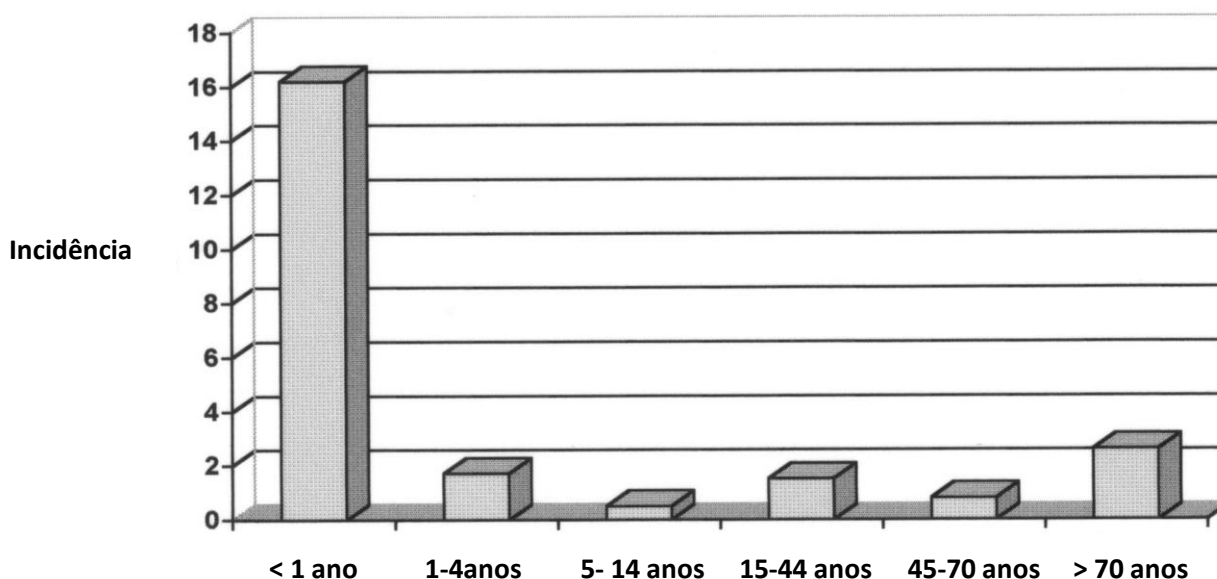
Ainda assim, NTHi apresenta um papel minoritário no que respeita às doenças do trato urinário (Gilsdorf et al., 1997; Wallace et al., 1983).

## **2.2 Doenças invasivas**

A doença invasiva causada por *H. influenzae* caracteriza-se pelo isolamento de microrganismos a partir de locais que normalmente são estéreis, podendo manifestar-se sobretudo sob a forma de infeções graves como meningite ou septicémia (Ladhani et al., 2010).

Com a introdução da vacina conjugada contra *H. influenzae* tipo b, na década de 1990, em programas de imunização infantil, observou-se um decréscimo significativo nas infeções invasivas causadas por Hib, nos países que incorporaram a mesma nos seus programas de vacinação, como se observa na tabela 3 (Ladhani et al., 2010; Ulanova & Tsang, 2009).

Assim sendo, na era pós vacinação, outras estirpes deste mesmo microrganismo ganharam relevo e maior importância como causa de doenças invasivas. Como tal THi não foi exceção, chegando mesmo a ser a estirpe que maior número de doenças invasivas causa. O foco da incidência destas infeções desencadeadas por NTHi é sobretudo em crianças com idade inferior a 1 ano e em indivíduos com idade superior a 65 anos, ao invés do que se verifica com *H. influenzae* tipo b que provoca sobretudo meningite em crianças saudáveis com idades inferiores a 5 anos. Porém, indivíduos imunodeprimidos ou portadores de doenças crónicas cardiovasculares e respiratórias podem igualmente ser afetados (Agrawal & Murphy, 2011; Van Eldere et al., 2014).



**Figura 2-** Distribuição da incidência de infecções invasivas causadas por NTHi de acordo com a idade dos indivíduos. Adaptado de, Hernando, Roma, & Pe, 2004

Tendo em conta que a doença invasiva provocada por NTHi tem aumentado ao longo dos anos (tabela 3), sendo bastante mais prevalente em contraste com *H. influenzae* tipo b, que apresenta apenas um peso de 20% no total das infecções invasivas, torna-se crucial compreender os motivos que levaram a um aumento de infecções invasivas causadas por NTHi.

As razões aparentam ser três: (Langereis & Jonge, 2015)

**Tabela 3-** Casos de doença invasivas causadas por *Haemophilus influenzae* desde a introdução de uma vacina polissacarídea conjugada contra *H. influenzae* tipo b. Adaptado de, Langereis & Jonge, 2015

Local	Período da colheita	Incidência dos casos de NTHi	Serotipo b isolado	NTHi isolados	Serotipos não-b isolados
Europa	1996-2006	↑	35%	56%	9%
Portugal	2002-2010	↑	13%	77%	10%
Espanha	2008-2013	↑	1%	85%	14%
E.U.A	1999-2008	↑	4%	70%	26%

✓ **Introdução de uma vacina polissacarídea conjugada contra *H.influenzae* tipo b-** Esta vacina possui um elevado potencial imunogénico por ação do seu conjugado polissacarídeo, contudo apenas confere proteção contra o serotipo b, o que aumenta a probabilidade de NTHi causar infeção invasiva. O facto de a taxa de transmissão em pais de crianças vacinadas ter aumentado de 23%, num período de pré vacinação, para 40% num período pós vacinação leva também a concluir que a transmissão é agora mais abundante em adultos saudáveis o que pode contribuir para o maior aparecimento de infeções invasivas observadas nos últimos 20 anos, como indica o estudo evidenciado pela tabela 3 (Langereis & Jonge, 2015).

✓ **Aumento da virulência das estirpes de NTHi-** A versatilidade genética que NTHi possui, permite que sejam efetuadas trocas de ADN entre as estirpes com alguma frequência, o que resultará na aquisição de novos fatores de virulência, sendo esta uma das possíveis razões para o aumento de infeções invasivas por NTHi (Langereis & Jonge, 2015).

✓ **Mudanças demográficas-** Tal como referido anteriormente nesta secção, a epidemiologia das infeções causadas por *H. influenzae* tem sofrido mudanças bastante evidentes nos últimos 20 anos. Ao contrário do que se observava há uns anos atrás, em que as doenças invasivas eram provocadas sobretudo por *H. influenzae* tipo b, nos dias de hoje NTHi é uma das maiores causas de doenças invasivas, particularmente em crianças e idosos.

Embora as razões para esta incidência ainda estejam pouco estudadas, existem algumas explicações que podem sustentar este facto.

O sistema imunológico do hospedeiro possui um papel crucial na defesa contra infeções causadas por NTHi e nesse sentido, facilmente se compreende que o sistema imunológico das crianças é menos desenvolvido e o dos idosos apresenta-se mais debilitado. Assim sendo, existe menos capacidade de resposta por parte destes dois grupos, motivo pelo qual poderão ser os mais afetados.

Também os fatores predisponentes ou de risco poderão induzir a colonização de NTHi, sendo o tabagismo um dos fatores de risco com maior relevância.

Por outro lado, recentemente, alguns estudos evidenciam a importância da ligação de IgM à superfície bacteriana. Esta descoberta enfatiza o papel desta imunoglobulina na defesa imunológica contra este agente patogénico. Por forma a compreender melhor este mecanismo de defesa é de referir que as células produtoras de IgM, CD27+, são pouco abundantes em crianças e aumentam cerca de 20% nos adultos, contudo volta a verificar-se um decréscimo nos idosos. Neste sentido, quanto menor a quantidade de imunoglobulina menor a capacidade de resposta contra infeções invasivas causadas por NTHi.

Por último, no caso particular dos idosos, estes também apresentam a sua imunidade celular comprometida, com uma diminuição da função dos neutrófilos. Desta forma, e tendo por base o facto de estes serem bastante eficazes no processo de fagocitose, facilmente se depreende que a diminuição da capacidade fagocitária é algo que leva a um compromisso do sistema de defesa do hospedeiro (Langereis & Jonge, 2015).

### **3. Fatores de virulência**

As estirpes de *H. influenzae* capsuladas, são seguramente mais virulentas do que as estirpes de NTHi, devido à presença da cápsula polissacarídea.

Contudo, as estirpes de NTHi, apresentam estruturas de superfície que lhes confere virulência, tornando-as capazes de causar doença.

Nesse sentido, torna-se essencial perceber quais os fatores de virulência associados a NTHi, bem como os seus mecanismos de interação com as células hospedeiras (Erwin & Smith, 2007).

#### **3.1 Adesinas**

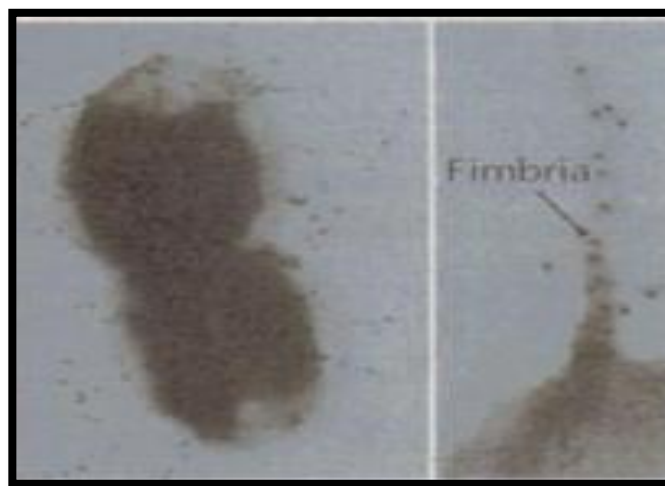
##### **i. Fímbrias ou Pilis**

As fímbrias, também denominadas de pilis, são características de *H. influenzae* tipo b, bem como de algumas estirpes de NTHi.

Estas estruturas são consideradas fatores de colonização desta mesma bactéria, o que indica que têm a capacidade de promover a adesão ao muco respiratório, assim como a adesão bacteriana às células epiteliais. A referida adesão constitui um papel crucial no processo de infecção (Ronander et al., 2009).

As fímbrias de *H. Influenzae* são compostas por uma proteína Major (HifA) e duas proteínas Minor (HifD e HifE). A proteína HifE tem a capacidade de provocar hemaglutinação e de favorecer a adesão às células epiteliais (Rahman, 2009).

Por outro lado, em estirpes de *H. Influenzae* não tipável, conhece-se também a presença de uma outra proteína, P5-Fimbrina, cuja estrutura é bastante semelhante à proteína P5 da membrana externa, e que tal como acontece com a proteína HifE, favorece a adesão às células humanas (Rahman, 2009).



**Figura 3-** Figura representativa de fímbrias de *Haemophilus influenzae*. Retirado de, Moxon, Rainey, Nowak, & E. Lenski, 1994

### **3.2 Proteínas auto-transportadoras**

#### **i. HMW1 e HMW2**

Estas proteínas de elevado peso molecular, têm propriedades adesivas, sendo também denominadas, por isso adesinas,

São consideradas os principais fatores de virulência de NTHi e a sua principal função, tal como o próprio nome indica, é promover a adesão a células epiteliais humanas.

A sua presença verifica-se exclusivamente em estirpes de NTHi, sendo que se encontram em quase 80% das mesmas (Rahman, 2009).

## **ii. Proteína Hap**

Hap pertence a um grupo de proteínas denominadas auto-transportadoras, e trata-se de uma proteína adesiva, com um peso molecular de 155 kDa, cujas principais funções são as de adesão e invasão das células epiteliais respiratórias, assim como a adesão a proteínas da membrana externa.

Esta proteína apresenta dois domínios: um que contém uma região adesiva que promove a adesão a células epiteliais e a proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, laminina e colagénio IV; e outro domínio com uma serina protease que interfere com a clivagem auto-proteolítica, atividade essa que atua melhor após invasão celular.

O facto de existirem duas regiões distintas nesta proteína, tem suscitado bastante interesse por parte de vários cientistas, principalmente no que respeita à descoberta de novas vacinas para combater as infeções por NTHi (Rahman, 2009; N. a. Spahich & St. Geme, 2011; N. A. Spahich et al., 2014).

## **3.3 Protease IgA**

A protease IgA existe em mais de 97% das estirpes de NTHi e é um fator que está fortemente relacionado com a virulência e consequente patogenicidade da bactéria (Rahman, 2009).

Esta proteína bacteriana, tem a capacidade de clivar a imunoglobulina humana predominante na cavidade nasofaríngea (IgA1).

A imunoglobulina humana impede a aglutinação de bactérias nas membranas, inibindo a interação da bactéria com a superfície das mesmas, devido à fagocitose, à



ligação e neutralização de toxinas e enzimas microbianas (Clementi et al., 2014; N. a. Spahich & St. Geme, 2011).

Por outro lado, a protease IgA possui ação proteolítica, clivando e eliminando estes mecanismos de proteção, o que favorece, consequentemente, a colonização bacteriana (N. a. Spahich & St. Geme, 2011).

Deste modo, pensa-se que a protease IgA é um fator crucial para que NTHi persista nas células epiteliais do aparelho respiratório (Clementi et al., 2014).

Recentemente, foram identificadas em NTHi duas variantes da protéase IgA, IgaA e IgaB. Embora as funções das referidas protéases não estejam totalmente esclarecidas, bem como de que forma IgaA aumenta o tempo de permanência de NTHi nas células hospedeiras, sabe-se que IgaA permite facilitar a invasão das células epiteliais e IgaB tem a capacidade de aumentar a persistência intracelular de NTHi (Farshid & Riesbeck, 2014).

### **3.4 Proteína D**

Esta lipoproteína é encontrada em estirpes de NTHi e está envolvida na patogênese das infecções do trato respiratório causadas por este microrganismo.

A capacidade virulenta desta proteína, está relacionada com a ação da sua glicofosfodiesterase, que liberta fosforilcolina e dessa forma, possui capacidade de danificar os cílios da nasofaringe.

Uma vez que a proteína D é um dos fatores mais virulentos de NTHi mas também um dos mais conservados, pensa-se que a criação de uma vacina utilizando-a como alvo poderá ser utilizada com sucesso, com o objetivo de impedir, entre outras, uma das doenças mais causadas por esta bactéria nos humanos, a otite média (Forsgren, Riesbeck, & Janson, 2008; Rahman, 2009).

### 3.5 Lipooligossacárido

A maioria das bactérias de Gram negativo possui uma endotoxina, denominada lipopolissacárido (LPS) (Choi et al., 2014).

Contudo, a espécie *H. influenzae*, ao invés do que acontece com outras bactérias de Gram negativo, contém uma endotoxina que não tem cadeia lateral terminal repetitiva, a qual dá pelo nome de antígeno O, e nesse sentido denomina-se lipooligossacárido (LOS) (Rahman, 2009).

O LOS trata-se de um componente principal e essencial da membrana externa bacteriana, que está fortemente relacionado com a patogenicidade do género *H. influenzae* (Morey et al., 2013).

### 3.6 Proteínas da membrana externa (PME)

A membrana externa bacteriana, tal como mencionado anteriormente, trata-se de um dos componentes da parede celular, sendo responsável pela prevenção da perda de proteínas periplasmáticas (específicas de cada estirpe), assim como evitar o acesso de enzimas hidrolíticas e de certos antibióticos ao peptidoglicano.

Da membrana externa fazem parte várias lipoproteínas, também denominadas proteínas da membrana externa, as quais se encontram na camada interna da mesma (L. V. Michel et al., 2013a).

Nesse sentido, para NTHi, são conhecidas as proteínas de membrana P2, P5 e P6, as quais serão apresentadas de forma mais detalhada abaixo.

#### i. Proteína de membrana externa P2

A proteína de membrana P2 é a mais abundante, correspondendo a 50% das proteínas de membrana externa (Ostberg, Russell, & Murphy, 2015).

Esta apresenta-se sob a forma de uma porina homotrimérica, permitindo por este motivo a entrada de nutrientes na célula bacteriana. Por outro lado, possui a capacidade de atuar como um prião, o que significa que por si só atua como uma molécula patogénica (Rahman, 2009).

Quanto à sua importância, esta está fortemente relacionada com o facto de P2 ser considerada como um potencial antígeno vacinal. Desta forma, vários estudos têm investigado uma forma eficaz de prevenir infeções causadas por NTHi. Assim sendo, sabe-se que através da utilização de anticorpos bactericidas, se demonstra uma atividade bactericida favorável, levando a constatar que a utilização dos referidos anticorpos confere proteção.

Ainda assim, vários desafios se têm colocado no caminho, sendo que o principal será a heterogeneidade da sequência de P2 entre as diferentes estirpes. Neste sentido, o sucesso de uma vacina baseada em P2 necessitaria de uma estabilidade de sequências durante a colonização, por forma a considerarem-se epítomos imunologicamente e estruturalmente estáveis (Hiltke, Sethi, & Murphy, 2002; Ostberg et al., 2015; Rahman, 2009).

## **ii. Proteína de membrana externa P5**

A proteína P5 tem recebido uma considerável atenção enquanto potencial candidato a uma vacina, uma vez que está envolvida na colonização e patogénese bacteriana, possuindo capacidade de se ligar aos recetores de membrana do hospedeiro, como por exemplo células epiteliais brônquicas e moléculas do antígeno carcinoembrionário.

Contudo, a interação de P5 com estes recetores ainda não se encontra bem esclarecida (Hill et al., 2001; Zakharian & Reusch, 2007).

## **iii. Proteína de membrana externa P6**

Outra proteína de membrana com relevância, é a P6. Esta proteína aparece associada ao peptidoglicano e possui uma atividade imunomoduladora, assim como tem a particularidade de ser um indutor seletivo de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos humanos.

Desde a sua descoberta, na década de 1980, P6 tem sido um forte candidato para uma vacina contra infeções provocadas por NTHi.

Nesse sentido, algumas descobertas têm sido realizadas e sabe-se nos dias de hoje que, ao contrário do que se observa com P2, P6 apresenta os seus domínios conservados entre as diversas estirpes patogénicas, uma vez que apresenta uma elevada homologia na análise de aminoácidos.

Portanto, os anticorpos produzidos contra esta proteína detêm atividade bactericida contra a mesma e permitem uma eficácia a longo prazo, uma vez que podem permanecer no soro humano por longos períodos de tempo (L. V. Michel et al., 2013b; Rahman, 2009).

### **3.7 Biofilme**

Um biofilme caracteriza-se por ser uma comunidade estruturada de células bacterianas, envoltas numa matriz aderente polimérica, autoproduzida pelo conjunto de microrganismos, e que possui capacidade para aderir às superfícies celulares do hospedeiro e material inerte. (Murphy & Kirkham, 2002)

A estrutura de um biofilme compreende a presença de várias moléculas, as quais têm a função de fornecer nutrientes essenciais, assim como criar condições ambientais favoráveis para a sobrevivência do biofilme e oferecer integridade à matriz.

A matriz polimeria microbiana que constitui o biofilme é altamente hidratada, uma vez que mais de 97% da sua composição é água, o que favorece ligações de hidrogénio entre as células microbianas incorporadas. O elevado teor de água desta estrutura permite ainda um correto fluxo de nutrientes e oxigénio, o que proporciona um ambiente favorável à sobrevivência da comunidade existente no biofilme. (Ranganathan, 2014)

Por outro lado, existem outros componentes que compõem esta mesma matriz, incluindo células microbianas (2-5%), polissacarídeos (1-2%), proteínas, DNA e RNA essenciais para a estrutura do biofilme, e iões. Estas substâncias conferem proteção ao biofilme, aumentam a sua estabilidade mecânica e regulam os processos metabólicos. (Ranganathan, 2014)

A formação do biofilme também é algo que tem recebido bastante atenção por parte dos investigadores e é um processo que se divide em quatro etapas: 1) contacto

inicial com a superfície; 2) adesão reversível; 3) adesão irreversível; 4) maturação e dispersão do biofilme.

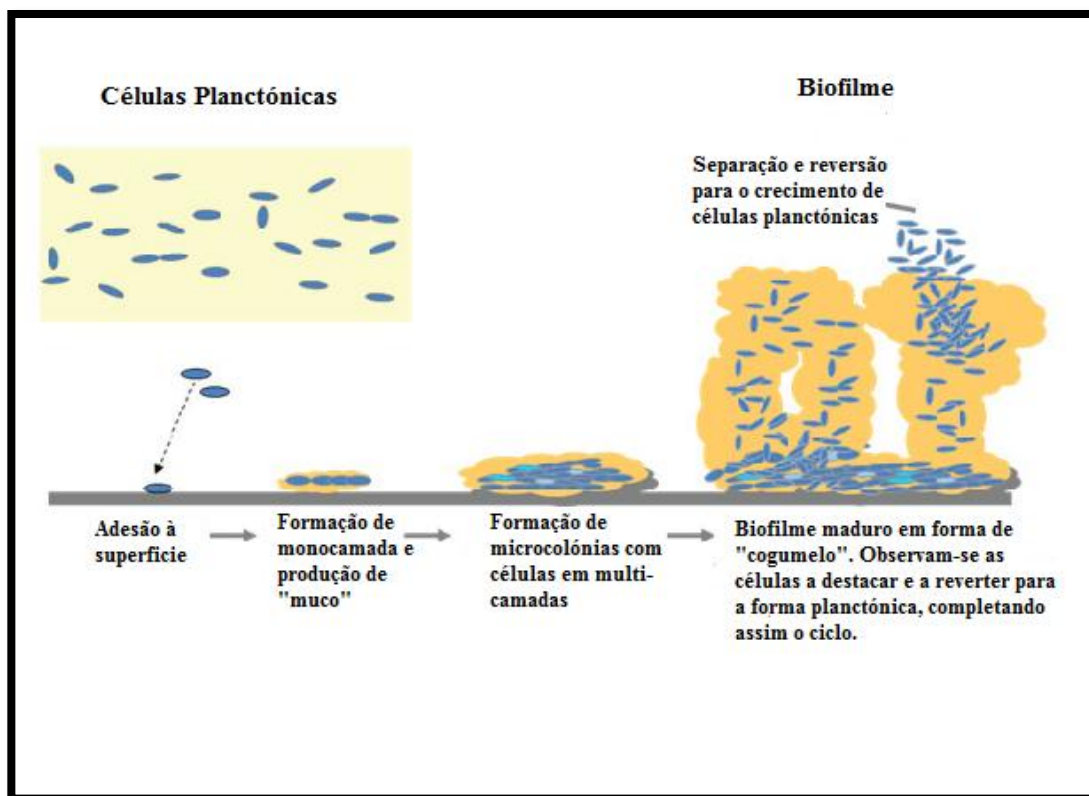
Desta forma, numa fase inicial acontece a adesão bacteriana por ação de forças gravitacionais, assim como pela expressão de fatores de adesão por intermediário das propriedades físico-químicas e forças eletrostáticas entre as bactérias e o substrato. Assim, a interação inicial entre a comunidade bacteriana e a superfície é favorecida e a primeira etapa de formação do biofilme está concluída.

Numa segunda fase, sucede a adesão reversível, através da motilidade flagelar, o que permite que as bactérias superem os efeitos repulsivos das forças hidrodinâmicas e eletrostáticas, formando uma monocamada. Esta adesão é resultado das forças que existem entre as bactérias e a superfície e ocorre durante a fase planctónica. Fatores ambientais, como pH, temperatura e forças iónica do meio influenciam esta fixação.

Na etapa de adesão irreversível, esta envolve a ação das fímbrias, as quais exercem uma adesão irreversível ao substrato, formando um aglomerado de células em várias camadas dentro da matriz.

A formação do biofilme culmina com a maturação e dispersão do mesmo. O crescimento tridimensional do biofilme seguido da fase de adesão irreversível indica a maturação do mesmo. As células que compõem o biofilme maturado apresentam características diferentes das respetivas células planctónicas, uma vez que possuem características fisiológicas distintas. Nesta fase, uma vez atingida a população desejada para um determinado biofilme, as células são dispersas e é iniciado um novo ciclo através do crescimento de células planctónicas. (Ranganathan, 2014)

As várias etapas de formação e desenvolvimento do biofilme, mencionadas acima são ilustradas pela figura 4.

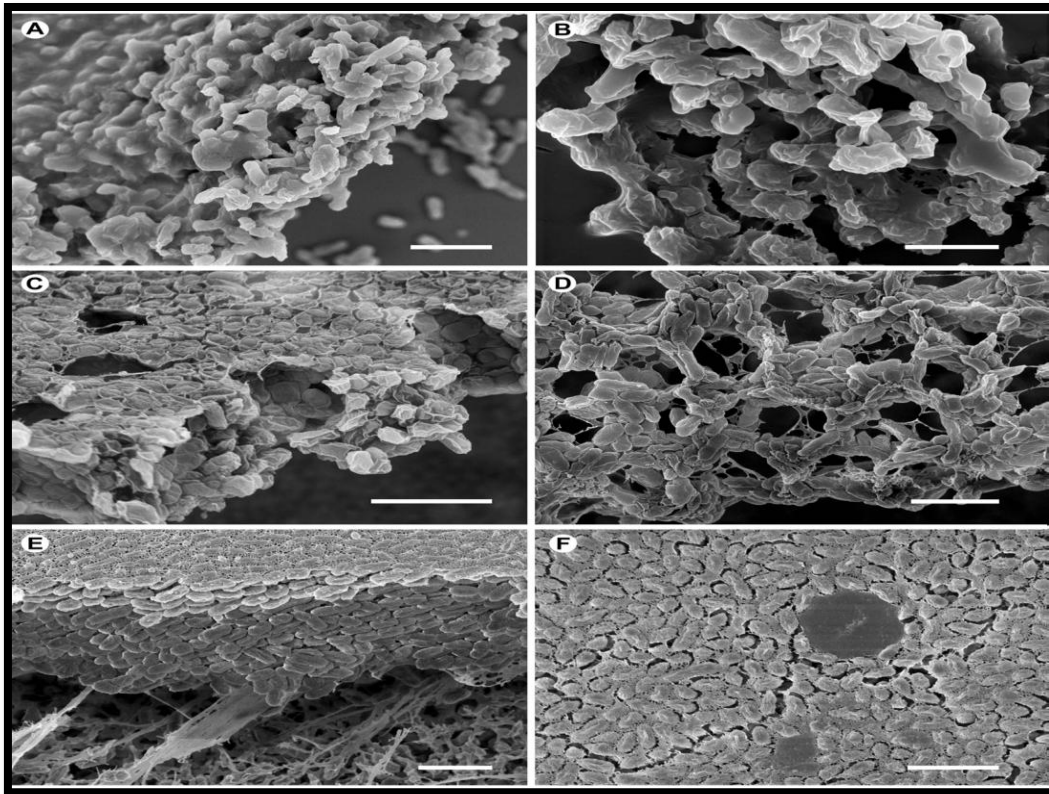


**Figura 4-** Etapas de formação e desenvolvimento de um biofilme. Adaptado de, Ranganathan, 2014

Ao longo dos últimos anos NTHi tem sido associado a este tipo de estrutura, dando ênfase à sua importância enquanto agente patogénico multirresistente. Isto porque, bactérias que se encontram em biofilmes, têm demonstrado uma importância extrema enquanto causadoras de infeções com baixa resposta à terapêutica antibiótica.

Os biofilmes são mais resistentes à ação antibacteriana, em comparação com infeções bacterianas cujas bactérias não se encontram inseridas neste tipo de estrutura, assim como apresentam maior resistência ao sistema imunitário do hospedeiro.

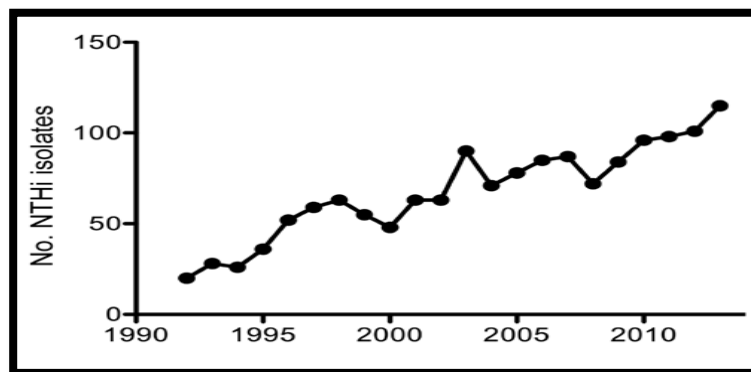
Neste sentido, compreender a natureza molecular da matriz do biofilme de NTHi é de interesse no desenvolvimento de estratégias com o intuito de combater infeções crónicas mais virulentas (Cho et al., 2015; Gallaher, Wu, Webster, & Aguilera, 2006; Murphy & Kirkham, 2002; Swords, 2012).



**Figura 5-** Imagem de biofilme de *Haemophilus influenzae* não tipável com recurso a microscopia eletrónica sob diferentes condições de crescimento. Lamelas de vidro estéril cobertas com suspensões de NTHi em caldo BHI. Retirado de Gallaher et al., 2006

#### 4. Epidemiologia

Desde a introdução da vacina contra Hib, NTHi ganhou bastante destaque enquanto causador de infeções invasivas como é o caso de doenças como a meningite ou septicémia.



**Figura 6-** Número de NTHi isolados de indivíduos com infeção invasiva entre 1992-2013 na Holanda. Retirado de, Langereis & Jonge, 2015

Por conseguinte, os estudos epidemiológicos realizados a nível mundial, europeu e em Portugal recaem sobre situações mais complicadas e preocupantes para a saúde pública como as infeções invasivas.

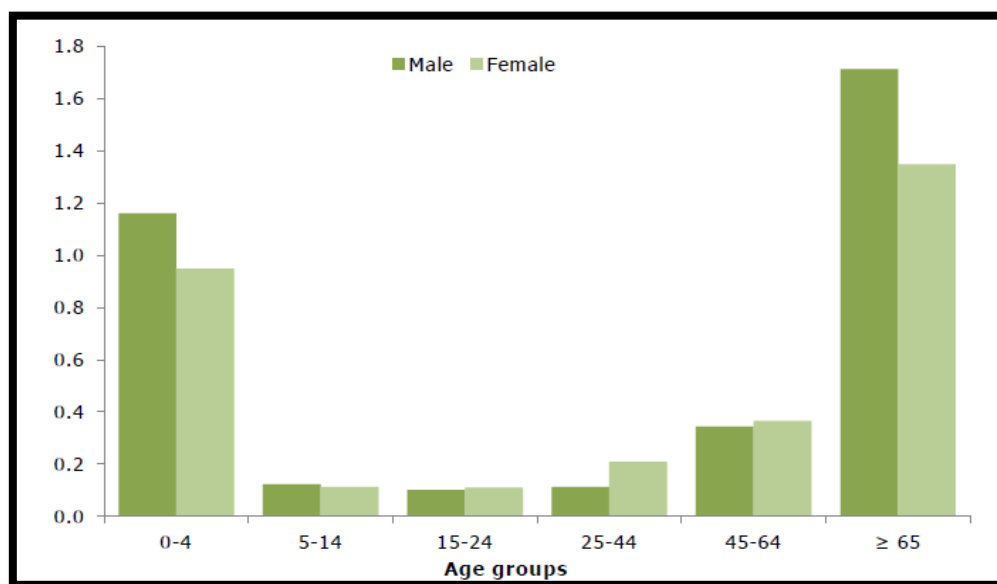
Assim sendo, na presente monografia será abordada a epidemiologia das doenças invasivas causadas por NTHi no mundo, na europa e em Portugal, na esperança porém de que estudos posteriores avaliem a epidemiologia global de NTHi enquanto causador de infeções não invasivas.

#### **4.1 Epidemiologia Mundial e na Europa**

Com a introdução da vacina contra Hib entre 1990 e 2009 em todos os países da europa, os relatos de doenças invasivas tornaram-se menos frequentes para o serotipo b (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015).

Os casos de infeções invasivas causadas por Hib representam desde então uma incidência consideravelmente menor e NTHi ganhou destaque enquanto causador destas infeções especialmente em crianças até aos 5 anos de idade e em indivíduos com idade  $\geq 65$  anos de idade, sobretudo no género masculino. Esta tendência pode ser verificada por vários estudos realizados até agora, tais como: um estudo realizado pela ECDC, em 30 países da União Europeia (UE) e da Área Económica Europeia (AEE) no período entre 2008 e 2012, como se observa na figura 7 e num estudo do Center for Disease Control and prevention (CDC) nos EUA (Califórnia, Colorado, Connecticut, Georgia; Maryland, Minesota, Novo México, Nova York, Oregon e Tennessee) ilustrado pela tabela 4, que também demonstra esta mesma realidade.(CDC, 2013; MacNeil et al., 2011) (MacNeil et al., 2011)





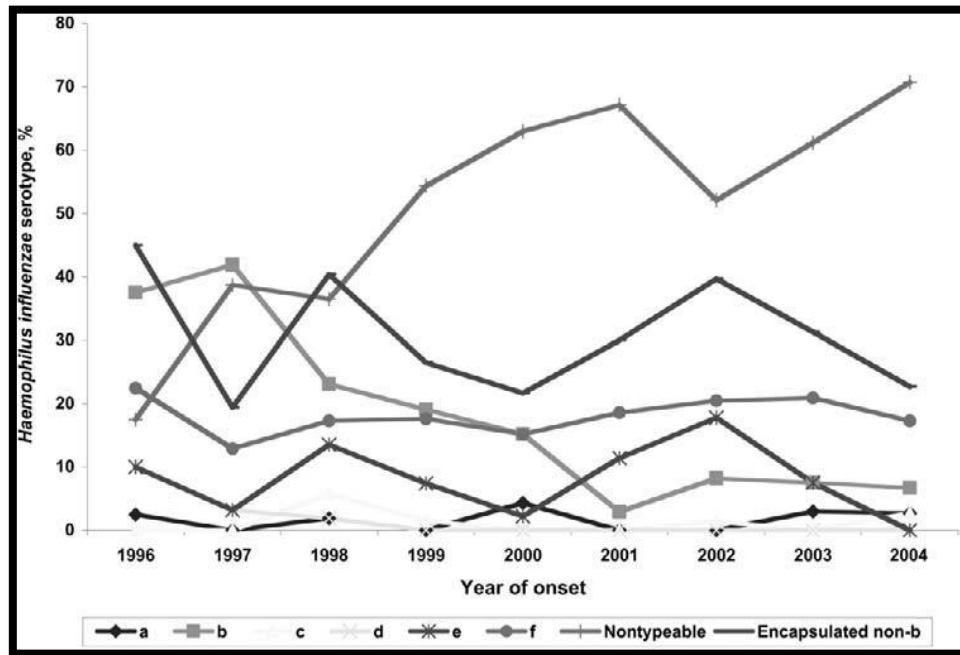
**Figura 7-** Casos de doença invasivas causadas por *H. influenzae* na Europa no ano de 2012, segundo a idade e o género. Retirado de, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015

**Tabela 4-** Casos de infeções causadas por Hib e NTHi, de acordo com a faixa etária no ano de 2012 em vários estados dos EUA (Califórnia, Colorado, Connecticut, Georgia; Maryland, Minesota, Novo México, Nova York, Oregon e Tennessee). Adaptado de, CDC, 2013

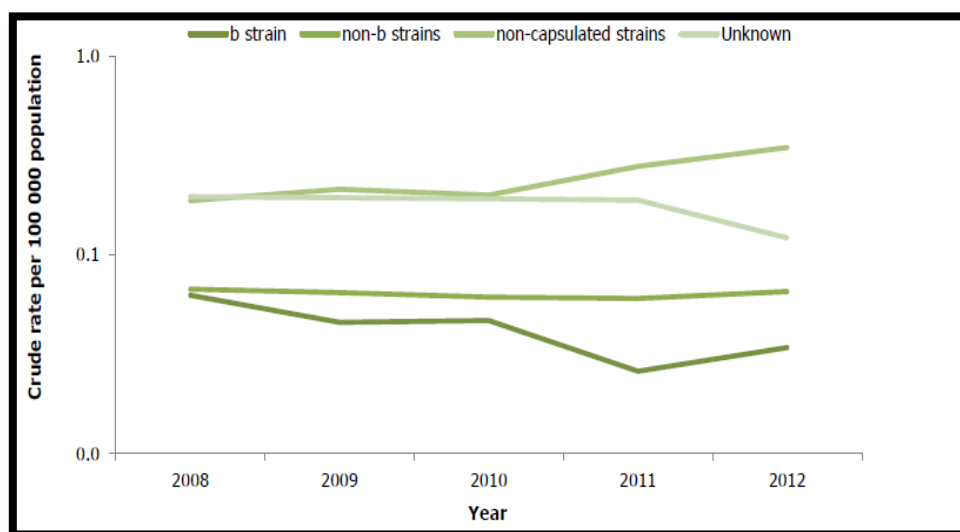
IDADE	Hib	NTHi
< 1	2	27
1	0	6
2-4	3	9
5-17	1	14
50-64	3	91
≥65	1	220

Tanto em países da União Europeia assim como pelo mundo, em países como Austrália e Estados Unidos da América, NTHi aumentou a incidência a partir da era em que se introduziu a vacinação.

Estes dados são sustentados com dois estudos, o primeiro estudo decorreu durante o período de 1996-2004 no estado do Illinois (EUA), como ilustra a figura 8, o segundo estudo publicado pela ECDC que demonstrou este mesmo aumento de incidência entre 2008 e 2012 em países da EU e da AEE, como comprova a figura 9. (Berndsen, Erlendsdóttir, & Gottfredsson, 2012; Blain et al., 2014; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015; MacNeil et al., 2011).



**Figura 8-** Percentagem de cada serotipo de *Haemophilus influenzae* entre 1996-2004 em Illinois (EUA). Retirado de, Dworkin & Borchardt, 2007



**Figura 9-** Casos reportados de doenças invasivas causadas por *H. influenzae* por ano e serotipo na EU/AEE. Retirado de, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015

Segundo dados da *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), no ano de 2012 foram confirmados 2545 casos de doença invasiva causada por *H. influenzae* em 27 países, tendo-se observado uma tendência ligeiramente ascendente comparativamente ao período de 2008-2011.

As taxas mais elevadas em 2012 foram relatadas pela Suécia e Noruega, seguido da Finlândia, Dinamarca e Reino Unido, sendo que em Portugal foram relatados 45 do total dos casos de doença invasiva (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015).

Assim sendo, é importante manter-se as taxas de imunização das populações por meio de vacinação, uma vez que a mesma se mostrou bastante eficaz segundo os dados epidemiológicos e realizar uma monitorização de todas as estirpes, nomeadamente as mais virulentas por forma a realizar uma correta avaliação da epidemiologia global.

#### **4.2 Epidemiologia em Portugal**

A vacina contra Hib é comercializada em Portugal desde 1994, sendo que apenas passou a integrar o Plano Nacional de Vacinação (PNV) desde Junho do ano 2000 para todas as crianças em idade pré-escolar ( $\leq 5$  anos de idade). A introdução da mesma no PNV tem vindo a demonstrar uma elevada eficácia no combate às infeções causadas por Hib, levando à quase total erradicação do serotipo b (Paula Lavado, 2009).

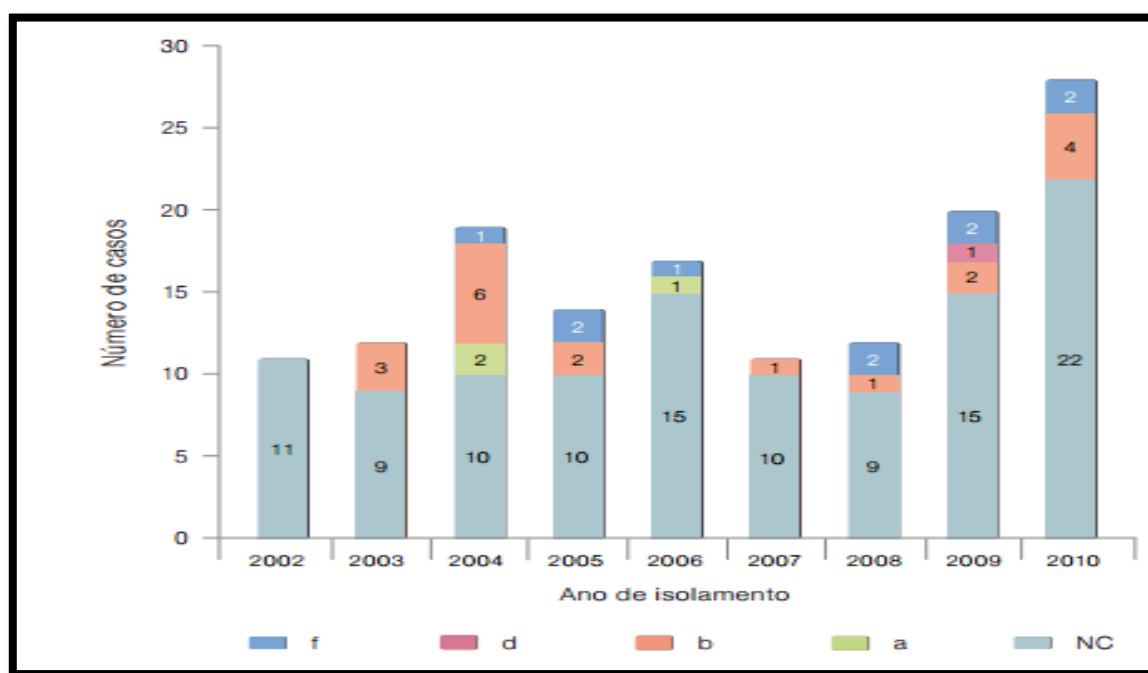
Em Portugal os estudos acerca de dados epidemiológicos das infeções invasivas causadas por *H. influenzae* são escassos, sendo que o primeiro estudo remonta ao período de 1989-2001. No referido estudo, Bajanca et al. descreveram mudanças no que respeita ao tipo capsular, mais propriamente relatando um declínio nas estirpes do tipo b acompanhado com um aumento das estirpes não tipáveis e da resistência antimicrobiana dos isolados de *H. influenzae*. O estudo abrangeu três períodos: a era pré-vacinação (1989-1993), o período em que a vacina contra Hib se tornou disponível, contudo ainda não era contemplada no PNV (1994- 1999), e os primeiros 18 meses após a sua introdução no PNV (2000-2001) (Bajanca & Canica, 2004).

Mais recentemente foi realizado um estudo em Portugal no período pós vacinação (2002-2010), o qual revelou uma diminuição de Hib enquanto causador de

doenças invasivas, com uma percentagem de apenas 13,2%, comparando com o período pré-vacinação, em que a percentagem era de 81%. Também o aumento do número de casos de doenças invasivas causadas por NTHi foi reportado neste estudo, apresentando uma incidência de 77,1% (Bajanca-Lavado, Simões, Betencourt, & Sá-Leão, 2014).

Ambos os estudos apresentaram resultados semelhantes, com uma diminuição da incidência de Hib no período pós vacinação e um aumento no aparecimento de estirpes de NTHi.

Tendo em conta estes dados, é possível compreender que a realidade em Portugal foi sofrendo alterações, uma vez que nos dias de hoje NTHi é a estirpe mais prevalente enquanto causadora de infeções invasivas, como ilustra a figura 9.



**Figura 10-** Distribuição dos serotipos de 144 doentes com infecção invasiva a *H. influenzae* entre 2002 e 2010. Retirado de, Bajanca-lavado & Simões, 2014

## 5. Imunidade

A bactéria NTHi é geralmente comensal do organismo humano. Porém, quando se verifica um compromisso do sistema imunitário do hospedeiro, NTHi pode tornar-se patogénico (Barenkamp, 2013).

Desta forma, quando NTHi se torna patogénico e interage com células epiteliais e células do sistema imunitário do hospedeiro, rapidamente são desencadeados vários mecanismos de resposta imune inata ou adquirida, por forma a combater uma possível infeção (Deknuydt, Nordstrom, & Riesbeck, 2014).

Neste sentido, torna-se crucial compreender a ação do sistema imunitário do hospedeiro, uma vez que se trata de um fator essencial na prevenção das doenças causadas por NTHi (Paul T. King & Sharma, 2015).

### **5.1 Defesa estrutural das vias aéreas**

A integridade estrutural das vias aéreas é um dos componentes fundamentais da imunidade. Assim, aspetos importantes, implicando um epitélio respiratório intacto, a produção de muco, a depuração mucociliar por ação dos cílios e a capacidade de tossir representam mecanismos fundamentais na prevenção contra infeções causadas por NTHi.

No caso particular de indivíduos com fibrose quística, estes apresentam uma limitação ao nível da função mucociliar o que permite que NTHi seja um microrganismo frequentemente encontrado neste tipo de patologia e com elevada capacidade de causar infeção.

Portanto, a insuficiência da função mucociliar está bastante associada a infeções causadas por NTHi, uma vez que este produz fatores de virulência capazes de inibirem ou causarem danos ao nível dos cílios, os quais compreendem o LOS e a proteína D, assim como tem a capacidade de secretar mediadores inflamatórios (Finney, Ritchie, Pollard, Johnston, & Mallia, 2014; Paul T. King & Sharma, 2015).

### **5.2 Imunidade inata**

A resposta imune inata não é específica para um determinado microrganismo e, desta forma, depende de algumas proteínas e células que medeiam a fagocitose por forma a reconhecer características exclusivas de cada microrganismo patogénico. Esta está envolvida na proteção de primeira linha contra as infeções e contém uma

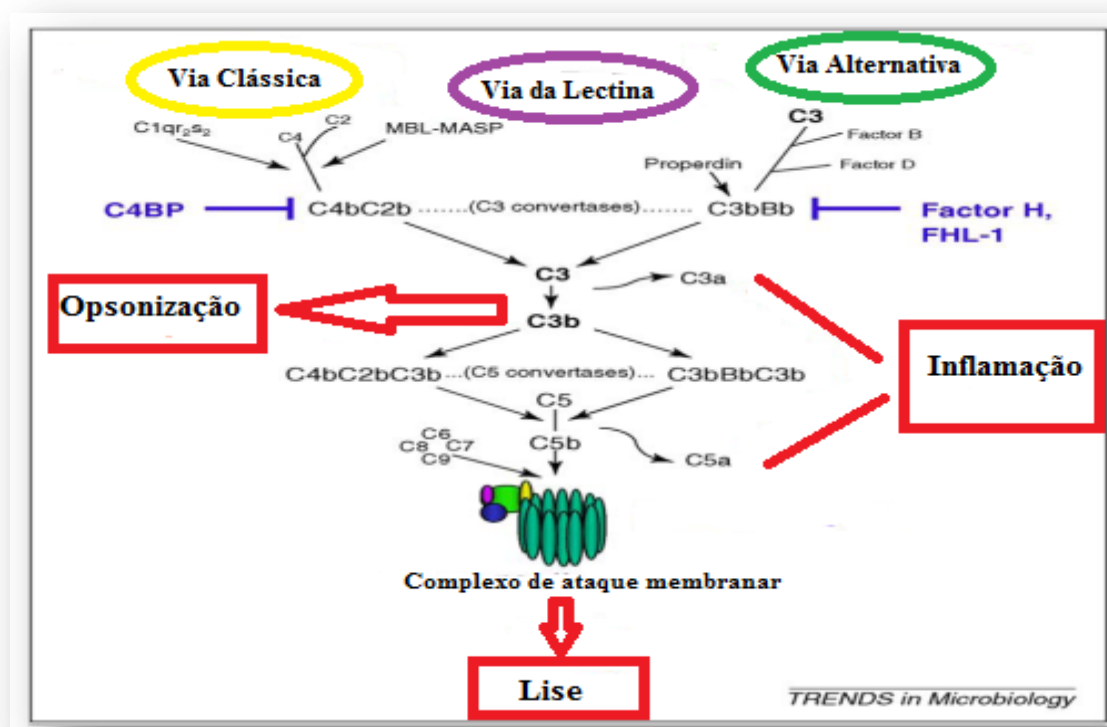
componente tanto estrutural como celular (Alberts et al., 2002; Paul T. King & Sharma, 2015).

### **5.2.1 Sistema do complemento**

O sistema do complemento compreende a primeira linha de defesa do sistema imunitário inato e possui uma parte essencial das defesas do hospedeiro.

Neste sentido, quando se dá uma interação entre NTHi e o hospedeiro, através da colonização da mucosa do trato respiratório, o sistema do complemento é iniciado e desencadeia os seus três principais mecanismos funcionais, sendo eles: a ativação da inflamação; opsonização de agentes patogénicos para posterior fagocitose; e lise dos microrganismos suscetíveis através do complexo de ataque membranar.

Os agentes patogénicos podem ativar o sistema do complemento através de três vias: a via clássica de ativação do complemento que é mediada pela ligação de imunoglobulinas (IgM ou IgG) aos antígenos, ou através do surgimento de proteína C reativa; a via da lectina, que é iniciada pela ligação de lectina à manose presente na superfície microbiana; por último, a via alternativa que é ativada pela libertação de componentes superficiais dos microrganismos patogénicos.



**Figura 11-** Sistema do complemento e respetivas vias de atuação. As três vias levam à formação de convertase C3 que possui a capacidade de clivar C3 a C3a (anaflitoxina) e C3b (opsoninas). Após este processo verifica-se a formação de C5 convertase e de seguida todas as vias seguem o mesmo percurso através do complexo de ataque membranar. Adaptado de, Hallström & Riesbeck, 2010

Embora o sistema do complemento seja crucial nas defesas do hospedeiro, na medida em que permite evitar danos extensos, é de realçar o facto de NTHi utilizar mecanismos de evasão contra o sistema do complemento por forma a persistir com a sua colonização no hospedeiro. Assim, NTHi constrói barreiras físicas que permitem a deposição de proteínas do complemento e adquire reguladores do complemento que previnem a lise bacteriana.

Posto isto, é de referir que a resposta imunitária do hospedeiro com recurso ao sistema do complemento é um assunto a aprofundar, uma vez que poderá representar um novo alvo terapêutico (Finney et al., 2014; Hallström & Riesbeck, 2010; Paul T. King & Sharma, 2015).

### 5.2.2 Resposta imunitária celular

A resposta imune celular é uma importante defesa contra agentes patogénicos respiratórios, como é o caso de NTHi.

Neste tipo de imunidade, a resposta é mediada por macrófagos presentes nas vias respiratórias, em situações de inflamação crónica, e em situações de inflamação aguda a resposta imune é mediada por neutrófilos.

Em situações de resposta inflamatória crónica, os macrófagos têm a capacidade de reconhecer recetores de superfície dos microrganismos patogénicos, como é o caso dos recetores *Toll-like* (TLR). A ligação destes recetores à superfície celular de NTHi possui um papel primordial na condução de respostas celulares, e dessa forma tem como consequência a fagocitose e consequentemente uma ação bactericida.

A presença de LOS na estrutura de NTHi é um dos motivos pelos quais existe reconhecimento por parte dos recetores TLR, mais especificamente o recetor TLR 4, assim como a PME 2 que é reconhecida pelo recetor TLR 2. Desta forma, estão apresentados os motivos pelos quais a colonização de NTHi desencadeia uma resposta imunitária celular (Finney et al., 2014; Paul T. King & Sharma, 2015).

### 5.3 Imunidade adquirida

A resposta imunitária adquirida compreende a imunidade humoral e a imunidade mediada por células. Esta é mediada por células B, numa vertente humoral, através da produção de anticorpos e por células T, numa vertente celular.

Desta forma, a imunidade adquirida caracteriza-se sobretudo pela capacidade que o organismo humano ganha para reconhecer elementos estruturais dos microrganismos patogénicos, mais propriamente antígenos, e consequente capacidade para gerar mecanismos com vista a destruir ou inativar os mesmos microrganismos (Paul T. King et al., 2003).



### **5.3.1 Imunidade humoral**

A imunidade humoral do hospedeiro, por ação dos anticorpos produzidos pelas células B, é induzida como resposta a uma vasta variedade de antígenos produzidos por NTHi. Exemplos específicos de antígenos produzidos por NTHi são as suas proteínas de membrana externa P2, P5 e P6, assim como adesinas, protease IgA e proteína D.

Desta forma, a imunidade humoral em associação com outros tipos de imunidade mencionados acima, como é o caso do sistema do complemento, tem um papel fundamental na prevenção das infecções causadas por NTHi.

De realçar que no estudo de King et al. os resultados sugeriram que a presença de IgM é um dos fatores fundamentais para que se verifique uma estimulação contínua da resposta imunitária. Ainda assim, sabe-se que uma deficiência imunológica em IgG está fortemente relacionada com infecções causadas por NTHi.

Neste sentido, compreende-se que a resposta imunitária humoral tem um papel decisivo na ação bactericida contra NTHi (P. T. King et al., 2008; Paul T. King & Sharma, 2015).

### **5.3.2 Imunidade mediada por células**

A imunidade mediada por células tem por base a ativação de macrófagos pela ação das células T, por forma a prevenir exacerbações na doença e conferir uma imunidade protetora.

Durante o início de uma infeção causada por NTHi as células T tornam-se funcionais, sobretudo as células *T helper* 1 e 2 e, nesse seguimento são libertadas interleucinas e citocinas. Para além disto, as células *T helper* 1 possuem, também, capacidade para reconhecer os recetores TLR 4, o que irá resultar em fagocitose e na morte celular bacteriana.

Assim, entende-se que a proliferação de linfócitos é importante na prevenção de infeções causadas por microrganismos patogénicos como é o caso de NTHi (Paul T. King & Sharma, 2015; Sharma & Pichichero, 2014).

## **6. Fatores de risco**

Existem fatores de risco e situações clínicas que aumentam a prevalência de infecções causadas por NTHi, uma vez que afetam a resposta imunitária e a colonização. As situações com maior relevância a este nível são o tabagismo e a existência de infecções virais como é o caso particular de Rhinovirus (Paul T. King & Sharma, 2015).

Neste seguimento, pretende-se esclarecer de que forma responde o sistema imunitário do hospedeiro nas situações supracitadas.

### **6.1 Tabagismo**

O tabagismo e a exposição passiva ao fumo são fatores de risco de extrema importância na medida em que o fumo do tabaco altera a estrutura pulmonar, a função celular e também contribui para o aumento de infecções do trato respiratório, como é o caso particular da DPOC causada por NTHi (Paul T. King & Sharma, 2015; Kulkarni et al., 2010).

Desta forma, compreende-se que os fumadores, sobretudo os ativos, acarretam um risco particularmente elevado para desenvolverem infecções tanto do trato respiratório superior como inferior, não só pelas alterações estruturais mas também pela diminuição da resposta imune do hospedeiro que também é afetada. (Kulkarni et al., 2010)

Assim, com a imunidade comprometida, verifica-se uma situação de stress oxidativo que resulta na ativação de macrófagos, células epiteliais e células T. Assim, dá-se uma resposta inflamatória amplificada, com secreção de citocinas inflamatórias e proteases que provocam danos tecidulares e dificultam a reparação dos tecidos.

Portanto, com as alterações supracitadas a colonização do hospedeiro por NTHi aparece facilitada, assim como o processo infeccioso (Marti-Llitas et al., 2009).

## **6.2 Infecções virais**

Uma co-infecção viral, principalmente por Rhinovirus, tem mostrado um papel muito importante na infecção bacteriana por NTHi sobretudo em indivíduos com DPOC (Paul T. King & Sharma, 2015).

Uma infecção viral por Rhinovirus, resulta numa baixa da resposta imunitária do hospedeiro. Nesta situação verifica-se um aumento da aderência bacteriana às células epiteliais do aparelho respiratório, o que consequentemente influencia negativamente a resposta bacteriana aos estímulos dos macrófagos (Mallia et al., 2012).

Assim, uma vez que a integridade estrutural do trato respiratório se encontra comprometida, estes factos indicam que uma infecção por Rhinovirus permite maior suscetibilidade por parte do hospedeiro para uma infecção bacteriana por NTHi (Paul T. King & Sharma, 2015; Mallia et al., 2012).

No estudo de Mallia et al., os resultados indicaram que uma infecção por Rhinovirus induziu uma coinfeção bacteriana por NTHi em 60% da população em estudo com DPOC em comparação com 10% do grupo controlo (Mallia et al., 2012).

## **7. Tratamento**

### **7.1 Mecanismos de resistência antimicrobiana**

A resistência de *H. influenzae* aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como aminopenicilinas ou cefalosporinas, apresenta um enorme desafio clínico, na medida em que a terapia antimicrobiana empírica é comumente implementada em situações de infeções do trato respiratório (Barbosa, Giufrè, Cerquetti, & Bajanca-Lavado, 2011).

Desde a década de 1980 que as estirpes de Hib e NTHi resistentes à ampicilina surgiram e começaram a ser definidos os fenótipos com base na referida resistência (García-Cobos et al., 2007).

Existem dois mecanismos principais relacionados com a resistência de NTHi à ampicilina. Assim sendo, um dos referidos mecanismos é o mecanismo enzimático, o

qual se caracteriza pela hidrólise dos anéis  $\beta$ -lactâmicos por ação das enzimas  $\beta$ -lactamases produzidas pela bactéria.

Outro dos mecanismos está relacionado com a diminuição de afinidade dos anéis  $\beta$ -lactâmicos para as proteínas de ligação às penicilinas (PLP).

As estirpes que exibem o mecanismo de resistência não enzimático, têm apresentado um impacto cada vez maior em todo o mundo e são designadas de estirpes “não produtoras de  $\beta$ -lactamases ampicilina resistentes” (BLNAR) ou “não produtoras de  $\beta$ -lactamases ampicilina suscetíveis” (BLNAS). As estirpes BLNAR caracterizam-se por terem uma concentração mínima inibitória (CMI) de 4 $\mu$ g/ml de ampicilina (Barbosa et al., 2011; Barry, Fuchs, & Brown, 2001; Witherden, Montgomery, Henderson, & Tristram, 2011).

O mecanismo não enzimático é também o mais comum encontrado nas estirpes de *H. influenzae*, sendo que num estudo realizado em Portugal, 93,1% das estirpes em estudo foram classificadas como estirpes BLNAR (Barbosa et al., 2011; García-Cobos et al., 2008).

Por outro lado, existem ainda estirpes que apresentam ambos os mecanismos de resistência e nesse caso, verifica-se resistência à ampicilina e ao ácido clavulânico. Assim, o fenótipo caracteriza-se como “produtora de  $\beta$ -lactamase ampicilina ácido clavulânico resistentes” (BLPACR) (Barbosa et al., 2011).

Estes mecanismos de resistência são resultado de alterações nas sequências de aminoácidos das PLP, derivado do uso inadequado de antibióticos orais.

Nesse sentido, estudos posteriores serão necessários por forma a haver maior compreensão destes mecanismos de resistência. Um conhecimento mais aprofundado a este nível pode ajudar no estabelecimento de medidas terapêuticas e preventivas adequadas para evitar as resistências apresentadas por estas estirpes (Barbosa et al., 2011; García-Cobos et al., 2007).

## 7.2 Terapêutica antibiótica

### i. Sinusite bacteriana

De acordo com as normas publicadas pela American Academy of Otolaryngology- Head and Neck Surgery Foundation (AAO-HNS), a terapêutica de primeira linha a instituir numa situação de sinusite bacteriana é a administração de amoxicilina.

Este é um antibiótico derivado das penicilinas e a justificação para a sua utilização como terapêutica de primeira linha relaciona-se com o facto de este fármaco ser seguro, eficaz e possuir baixo custo.

Por outro lado, aquando de uma situação de resistência microbiana à amoxicilina ou a presença de algum dos fatores indicados na tabela 5, justifica-se a toma de amoxicilina em associação com ácido clavulânico. Assim sendo, a dose recomendada é de 90 mg/Kg/dia por via oral, durante um período não inferior a 14 dias (Rosenfeld et al., 2015; Vidya R Devarajan, 2015).

**Tabela 5-** Situações que justificam a associação de amoxicilina com ácido clavulânico em detrimento do uso exclusivo de amoxicilina. Adaptado de, Rosenfeld et al., 2015

Fator	Motivo
Situações de provável resistência bacteriana	Utilização de amoxicilina no mês anterior
	Prestador de cuidados de saúde ou proximidade com um ambiente de cuidados de saúde
	Falha terapêutica com amoxicilina prévia
	Proximidade com crianças em idade escolar
	Fumador
	Infeções recorrentes apesar da profilaxia
Presença de infeções moderadas a graves	História clínica de sinusites recorrentes
	Sintomas moderados a graves
	Sintomas prolongados
Presença de comorbilidades ou extremos etários	Indivíduos diabéticos, com doença cardíaca, renal ou hepática
	Indivíduos imunocomprometidos
	Idade acima dos 65 anos de idade

Por outro lado, em situações particulares de reação de hipersensibilidade às penicilinas, existe necessidade de reajustar o tratamento, substituindo a terapêutica empírica. Nesse sentido, é preconizada uma terapêutica com recurso a tetraciclina, como por exemplo a doxiciclina, ou a fluoroquinolonas, como a levofloxacina. A efetividade das fluoroquinolonas é bastante semelhante à da amoxicilina, contudo os efeitos adversos são superiores, por este motivo esta classe antibiótica não é utilizada como escolha de primeira linha.

Quando as reações de hipersensibilidade às penicilinas não são reações do tipo anafiláticas mas sim reações citotóxicas ou celulares, a terapêutica a instituir compreende a utilização de clindamicina em associação com uma cefalosporina de terceira geração, como por exemplo a cefixima (Rosenfeld et al., 2015).

## **ii. Conjuntivite bacteriana**

O tratamento da conjuntivite bacteriana causada por NTHi é geralmente um tratamento tópico e deve ser realizado com recurso à classe das sulfonamidas, mais propriamente com sulfacetamida, cuja apresentação pode ser em colírio ou pomada. Este antibiótico, atua ao nível do DNA bacteriano, reduzindo o desconforto causado pela infeção como a vermelhidão e as secreções purulentas.

Por outro lado, o tratamento desta mesma infeção também pode ser efetuado por ação de um antibiótico da classe dos macrólidos como a eritromicina (Vidya R Devarajan, 2015).

## **iii. Otite média aguda**

A instituição da terapêutica na otite causada por NTHi carece de uma associação entre analgésicos, anti-inflamatórios e antibióticos.

Assim sendo, segundo as normas da Direção Geral da Saúde (DGS) para o diagnóstico e tratamento da otite média aguda em idade pediátrica, a terapêutica empírica para o tratamento desta infeção compreende a utilização de amoxicilina, com

uma dose de 80-90 mg/Kg/dia (Fernanda, Brett, Januário, Marques, & Gonçalves, 2014; Tristram, Jacobs, & Appelbaum, 2007).

No caso de se observar a persistência dos sintomas após 48-72 horas do início do tratamento com amoxicilina, deve recorrer-se à utilização de amoxicilina com ácido clavulânico. A cefuroxima ou ceftriaxona utiliza-se no caso de existir falência das opções prévias ou impossibilidade de toma por via oral.

Em situações especiais de hipersensibilidade às penicilinas como anafilaxia, deve-se dar primazia à utilização de macrólidos (claritromicina, eritromicina e azitromicina) (Fernanda et al., 2014).

	Antibiótico	Via	Dose	Nº tomas	Duração
1ª linha	Amoxicilina	oral	80-90 mg/kg/dia (máx 3 g/dia)	12/12h	<b>7 dias se:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Idade &lt; 2 anos</li><li>• OMA recorrente</li><li>• Falência do tratamento inicial</li></ul>
2ª linha	Amoxicilina + ác. clavulânico* (formulação 14:1)	oral/i.v.	80-90 mg/kg/dia (de amoxicilina) (máx 3 g/dia)	12/12h	
	Cefuroxima	oral	30 mg/kg/dia (máx 1 g/dia)	12/12h	
		i.v.	80-100 mg/kg/dia (máx 6 g/dia)	8/8h	
	Ceftriaxona**	i.v./i.m.	50 mg/kg/dia (máx 4 g/dia)	24/24h	
Alergia à penicilina tipo 1	Claritromicina	oral	15 mg/kg/dia (máx 1 g/dia)	12/12h	<b>5 dias se:</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Idade ≥ 2 anos</li></ul>
	Eritromicina	oral	50 mg/kg/dia (máx 2 g/dia)	6/6h ou 8/8h	
	Azitromicina***	oral	10 mg/kg/dia (máx 500 mg/dia)	24/24h	
Alergia à penicilina não tipo 1	Cefuroxima	oral	30 mg/kg/dia (máx 1 g/dia)	12/12h	
		i.v.	80-100 mg/kg/dia (máx 6 g/dia)	8/8h	

\* Usar como 1ª linha se tratamento nos 30 dias prévios com amoxicilina ou se suspeita de infeção por *S. aureus*. Nesta última situação preferir as outras formulações de amoxicilina + ácido clavulânico.

\*\* Tratamento durante 1 ou 3 dias. Recomendada duração de 3 dias se administrado por falência do tratamento antibiótico inicial.

\*\*\* Tratamento durante 3 dias.

**Figura 12-** Quadro resumo acerca dos antibióticos utilizados no tratamento da OMA segundo as normas da DGS. Retirado de, Fernanda et al., 2014

#### iv. Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC)

A abordagem à terapêutica da PAC exige antes de qualquer implementação, a realização de uma radiografia torácica. Após a confirmação da infeção, a terapêutica de

primeira linha em indivíduos previamente saudáveis e sem recurso a antibioterapia nos três meses anteriores, segundo a DGS é a amoxicilina numa dose de 500mg de 8/8 horas. Em contrapartida, em situações de hipersensibilidade ou resistência bacteriana à ampicilina, deve recorrer-se à utilização de azitromicina, 500mg por dia ou claritromicina, 500mg de 12/12 horas ou Doxiciclina, 200mg dose inicial, passando posteriormente a 100mg de 12/12 horas. Os macrólidos são uma opção terapêutica de segunda linha devido ao menor número de efeitos secundários frente a outras alternativas (Monteiro, Santos, Caetano, Pinto, & Heleno, 2011).

Por outro lado, em situações que se observem doença cardíaca crónica, doenças pulmonares, doença hepática, doença renal, diabetes mellitus, condições imunossupressoras ou utilização de antibióticos nos 3 meses anteriores, a terapêutica a instituir é diferente da mencionada anteriormente. Dessa forma, a DGS e a American Thoracic Society indicam a utilização de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina ou cefalosporinas) em associação de um macrólido. Em caso de se observar intolerância à terapêutica de 1ª linha, deve optar-se por fluoroquinolonas, levofloxacina, numa dose de 500mg uma vez por dia (Mandell et al., 2007; Monteiro et al., 2011).

<b>Previamente saudáveis e sem antibioterapia nos 3 meses anteriores</b>	<b>1ª linha</b>	Amoxicilina <sup>500mg 8/8 horas</sup>
	<b>Alternativas</b>	Azitromicina <sup>500mg por dia</sup> Claritromicina <sup>500mg 12/12 horas</sup> Doxiciclina <sup>200 mg dose inicial depois 100 mg 12/12 horas</sup>
<b>Doentes com comorbilidades* ou antibioterapia nos 3 meses anteriores</b>	<b>1ª linha</b>	Amoxicilina <sup>†</sup> 1gr 8/8h associada a uma das três seguintes: Azitromicina <sup>500mg por dia</sup> ou Claritromicina <sup>500mg 12/12 horas</sup> ou Doxiciclina <sup>200 mg dose inicial depois 100 mg 12/12 horas</sup>
	<b>Alternativas</b>	Levofloxacina <sup>500mg 24/24 horas</sup> ou Moxifloxacina <sup>400 mg 24/24 horas</sup>

\* Comorbilidades: DPOC; diabetes mellitus; doença cardíaca, hepática ou renal crónicas; neoplasia; alcoolismo; esplenectomia, imunocomprometido ou fármacos imunossupressores. † A cefuroxima (250 a 500mg de 12/12 horas) é uma alternativa caso exista intolerância.

O tratamento deve ter uma duração de **7 dias**. Se o tratamento incluir só claritromicina ou só uma fluoroquinolona pode-se descontinuar aos 5 ou 6 dias caso o doente se apresente apirético há 48-72 horas e clinicamente estável. O tratamento só com azitromicina deve ter uma duração de 3 dias.

**Figura 13-** Quadro resumo acerca dos antibióticos utilizados no tratamento da PAC segundo as normas da DGS. Retirado de, Monteiro et al., 2011



## **v. Exacerbações na DPOC**

A DGS apenas recomenda a utilização de antibioterapia em situações exclusivas de exacerbações bacterianas na DPOC associadas a expetoração purulenta ou quando ocorre necessidade de ventilação mecânica, sendo que não é recomendada a administração profilática de antibióticos num doente com DPOC estável.

Assim sendo e após um correto diagnóstico com recurso a culturas de expetoração dos doentes, a terapêutica antibiótica empírica deverá incluir amoxicilina ou amoxicilina em associação com ácido clavulânico, macrolidos ou doxiciclina durante um período de tratamento de 5 a 10 dias (António Bugalho de Almeida et al., 2013).

## **vi. Infecções invasivas**

Tendo em conta o facto de a meningite pertencer ao grupo de doenças infecciosas causadas por NTHi, a sua terapêutica deve ter uma ação mais rápida e nesse sentido faz-se por via sistémica e não por via oral.

Assim sendo, os antibióticos de eleição para o tratamento de uma infeção deste tipo incluem cefalosporinas de terceira geração, de largo espetro, por via intravenosa, como cefotaxima ou ceftriaxona em associação com vancomicina. No caso de não se verificar uma resposta positiva à terapêutica empírica, deve optar-se pela utilização de terapias alternativas incluindo azitromicina, antibióticos da classe das fluoroquinolonas no caso exclusivo dos adultos, ou cloranfenicol.

Estirpes BLNAS devem ter como terapia padrão uma cefalosporina de largo espetro como a ceftriaxona (Tristram et al., 2007; Vidya R Devarajan, 2015).

No caso da septicémia, deve iniciar-se a terapêutica com administração de antibióticos por via sistémica, como a ampicilina para estirpes  $\beta$ -lactamase negativas e que não pertençam ao fenótipo BLNAR ou cefalosporinas para estirpes  $\beta$ -lactamase positivas. Posteriormente deve-se dirigir a terapêutica para a patologia causadora deste tipo de infeção generalizada com base no microrganismo causador da mesma (Tristram et al., 2007).

## 8. Prevenção

### 8.1 Vacinação

A vacinação é a medida preventiva de eleição contra um vasto número de microrganismo e no caso particular de *H. influenzae* é mesmo o único recurso por forma a garantir a prevenção.

Em países que possuem um programa de vacinação ativo contra Hib, NTHi ganhou grande notoriedade e relevância, sendo mesmo a estirpe deste género que mais infeções causa, sobretudo OMA e exacerbações na DPOC (Murphy, 2015).

Pelo motivo supracitado, o desenvolvimento de uma vacina contra NTHi é necessário e urgente, direcionada principalmente para a prevenção e diminuição da incidência de OMA em crianças e exacerbações na DPOC em adultos. Contudo, progressos neste sentido têm apresentado grandes desafios ao nível da investigação devido à elevada heterogeneidade genética que se observa entre as estirpes de NTHi (Smith-Vaughan et al., 2014).

Vários fatores de virulência de NTHi têm sido e continuam a ser investigados como possíveis antígenos vacinais. Os progressos recentes têm permitido a caracterização de vários desses antígenos, sobretudo no que respeita aos seus papéis na patogénese bacteriana, na sua utilidade potencial enquanto antígenos vacinais, e nos seus papéis como alvos de resposta imune do hospedeiro.

Alguns dos alvos vacinais incluem as proteínas de membrana externa P2, P5 e P6, como já referido anteriormente neste trabalho, as adesinas, as proteínas auto-transportadoras HMW1 e HMW2, o LOS e também a proteína D, sendo estes fatores de virulência os alvos de pesquisa por parte de vários autores, com o intuito de descobrir uma vacina ativa contra os mesmos que induza uma resposta imunitária protetora no hospedeiro. Contudo, a identificação de regiões conservadas destas moléculas também apresenta um enorme desafio, e por se tratar de um aspeto essencial para garantir a eficácia da vacina, carece de uma investigação exaustiva (Grijalva, Leach, & Patel, 2014).

Neste sentido, a proteína D tem mostrado bastante relevância enquanto antígeno candidato a uma vacina contra NTHi, e embora ainda não exista nenhuma vacina

desenvolvida exclusivamente contra NTHi, existe no mercado uma vacina pneumocócica polissacarídea conjugada com proteína D de NTHi, cujo nome comercial é Synflorix® e é activa contra 10 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* (Smith-Vaughan et al., 2014).

Esta é uma vacina administrada para prevenção da pneumonia e a otite média aguda causada pelo *S. pneumoniae* em lactentes e crianças a partir das 6 semanas até aos 5 anos de idade, que tem o objetivo de induzir alterações na colonização microbiana da nasofaringe (GlaxoSmithKline Inc., 2015).

Contudo, no estudo de van den Bergh et al. a administração da vacina pneumocócica polissacarídea conjugada (NTHi proteína D) não mostrou qualquer influência na colonização da nasofaringe por NTHi, e no estudo de Feazel et al. não se observou uma alteração significativa no microbioma da nasofaringe, do qual faz parte NTHi (Bergh et al., 2013; Feazel et al., 2015).

Existe ainda uma outra vacina pneumocócica polissacarídea conjugada com proteína D, ativa contra 11 serotipos de *S. pneumoniae*. Esta ainda se encontra em fase de estudo, mais especificamente me fase II, sendo que por esse motivo não se encontra licenciada. A referida vacina apresenta a particularidade de cada um dos sacáridos de *S. pneumoniae* estar conjugado com derivados da proteína D de NTHi.

A avaliação do benefício da administração desta vacina enquanto preventiva contra NTHi encontra-se em estudo, ainda assim existem resultados que indicam uma redução de 35% na incidência de OMA causada por NTHi, após exposição ao antigénio, assim como uma tendência para a diminuição da colonização nasofaríngea por NTHi (Bergh et al., 2013; Smith-Vaughan et al., 2014).

Neste sentido, mais estudos e esforços são necessário na abordagem à prevenção com recurso à vacinação contra as infeções causadas por NTHi, especialmente no que respeita às doenças invasivas.

#### IV. CONCLUSÃO

Ao longo da presente monografia constatou-se que na última década, NTHi é uma das bactérias com maior prevalência em conjuntivite bacterianas e infeções do trato respiratório superior e inferior, como otite média aguda, sinusite bacteriana, pneumonia adquirida na comunidade e exacerbações na DPOC sobretudo em extremos etários como é o caso de crianças com idade  $\leq 5$  anos de idade e idosos com idade  $\geq 65$  anos de idade. Para além dos extremos etários, existem também fatores de risco que aumentam a probabilidade de colonização por NTHi no trato respiratório, sendo elas o tabagismo e infeções virais, especialmente infeções causadas por Rhinovirus.

Foi também possível concluir que existe uma escassez de estudos epidemiológicos no que respeita às doenças não invasivas causadas por NTHi, sendo que os mesmos apenas recaem sobre situações mais complicadas e preocupantes para a saúde pública como as infeções invasivas.

A realidade epidemiológica tanto no mundo e na europa como em Portugal, no que respeita à incidência de NTHi enquanto causador de infeções invasivas mudou bastante desde a introdução de uma vacina polissacarídea conjugada contra *H. influenzae* tipo b, uma vez que se observou um decréscimo das estirpes Hib e um aumento significativo nas estirpes de NTHi.

Assim sendo, e uma vez que a vacina supracitada apenas confere imunização contra Hib, os outros serotipos do género *Haemophilus* ganharam destaque, sobretudo NTHi, enquanto causadores de doenças como meningite e septicémia.

No presente trabalho foi possível constatar que NTHi apresenta elevadas taxas de resistência à ampicilina, uma vez que possui dois mecanismos de resistência, um mecanismo enzimático, que leva à hidrólise dos anéis  $\beta$ -lactâmicos por ação das enzimas  $\beta$ -lactamases e outro mecanismos relacionado com a diminuição de afinidade dos anéis  $\beta$ -lactâmicos para as PLP. Neste seguimento, é de extrema importância uma vigilância constante por parte dos grupos de investigação a este nível por forma a compreender quais as terapêuticas mais eficazes para combater as infeções causadas por este microrganismo.

Por último, é também possível reconhecer a urgente necessidade para a criação de uma vacina contra NTHi. Existem muitos esforços nesse sentido, contudo a heterogeneidade genética das sequências antigénicas deste agente patogénico, como PME, adesinas e LOS têm apresentado um enorme desafio na produção de uma vacina efetiva contra NTHi.

Desta forma, os dados recolhidos permitem afirmar que é pertinente continuar a investir no conhecimento de *H. influenzae* não tipável, essencialmente na abordagem à prevenção com recurso à vacinação contra infeções causadas pelo mesmo, nomeadamente no que respeita às doenças invasivas.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Agrawal, A., & Murphy, T. F. (2011). Haemophilus influenzae Infections in the H. influenzae Type b Conjugate Vaccine Era. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11), 3728–3732. <http://doi.org/10.1128/JCM.05476-11>
- Akter, S., Shamsuzzaman, S., & Jahan, F. (2014). Community acquired bacterial pneumonia : aetiology , laboratory detection and antibiotic susceptibility pattern. *Malays J Pathol*, 36(2), 97–103.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Raff, M., & Roberts, K. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (Routledge, Ed.) (4<sup>a</sup> ed.).
- António Bugalho de Almeida, Guimarães, M., Bárbara, C., Menezes, F., Cardoso, J., Winck, J. C., & Simão, P. (2013). Diagnóstico e Tratamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica. *Direção-Geral Da Saúde*, 1(1), 1–15.
- Bajanca, P., & Canica, M. (2004). Emergence of nonencapsulated and encapsulated non-b-type invasive Haemophilus influenzae isolates in Portugal (1989-2001). *J Clin Microbiol*, 42(2), 807–810. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.2.807>
- Bajanca-lavado, M. P., & Simões, A. S. (2014). Infecção invasiva a Haemophilus influenzae entre 2002 E 2010 : Caraterização Molecular E Padrão De Suscetibilidade Aos Antibióticos. *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge*, 15–19.
- Bajanca-Lavado, M., Simões, a., Betencourt, C., & Sá-Leão, R. (2014). Characteristics of Haemophilus influenzae invasive isolates from Portugal following routine childhood vaccination against H. influenzae serotype b (2002-2010). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33(4), 603–10. <http://doi.org/10.1007/s10096-013-1994-6>
- Barbosa, A. R., Giufrè, M., Cerquetti, M., & Bajanca-Lavado, M. P. (2011). Polymorphism in ftsI gene and {beta}-lactam susceptibility in Portuguese Haemophilus influenzae strains: clonal dissemination of beta-lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(4), 788–96. <http://doi.org/10.1093/jac/dkq533>
- Barenkamp, S. J. (2013). A New Human Colonization Model for Nontypeable Haemophilus influenzae. *Journal of Infectious Diseases*, 208(5), 717–719. <http://doi.org/10.1093/infdis/jit242>
- Barry, A. L., Fuchs, P. C., & Brown, S. D. (2001). Identification of beta-Lactamase-Negative, Ampicillin-Resistant Strains of Haemophilus influenzae with Four Methods and Eight Media. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), 1585–1588. <http://doi.org/10.1128/AAC.45.5.1585>

- Bergh, M. R. Van Den, Spijkerman, J., Swinnen, K. M., François, N. A., Pascal, T. G., Borys, D., ... Sanders, E. A. M. (2013). Effects of the 10-Valent Pneumococcal Nontypeable *Haemophilus influenzae* Protein D – Conjugate Vaccine on Nasopharyngeal Bacterial Colonization in Young Children : A Randomized Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*, 56, 30–39. <http://doi.org/10.1093/cid/cis922>
- Berndsen, M. R., Erlendsdóttir, H., & Gottfredsson, M. (2012). Evolving epidemiology of invasive *Haemophilus* infections in the post-vaccination era: results from a long-term population-based study. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(9), 918–23. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03700.x>
- Blain, A., MacNeil, J., Wang, X., Bennett, N., Farley, M. M., Harrison, L. H., ... Briere, E. (2014). Invasive *Haemophilus influenzae* Disease in Adults ≥65 Years, United States, 2011. *Ofid*, 1–8. <http://doi.org/10.1093/o>
- Bonaventura, M. P. D., Lee, E. K., DeSalle, R., & Planet, P. J. (2010). A whole-genome phylogeny of the family Pasteurellaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(3), 950–956. <http://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.08.010>
- CDC. (2013). Active Bacterial Core Surveillance ( ABCs ) Report Emerging Infections Program Network *Haemophilus influenzae*, 2012. *Center for Disease Control and Prevention, 2005, 2009*.
- Cho, C., Chande, A., Gakhar, L., Bakaletz, L. O., Jurcisek, J. a, Ketterer, M., ... Apicella, M. a. (2015). Role of the nuclease of nontypeable *Haemophilus influenzae* in dispersal of organisms from biofilms. *Infection and Immunity*, 83(3), 950–7. <http://doi.org/10.1128/IAI.02601-14>
- Choi, J., Cox, a. D., Li, J., McCready, W., & Ulanova, M. (2014). Activation of Innate Immune Responses by *Haemophilus influenzae* Lipooligosaccharide. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(5), 769–776. <http://doi.org/10.1128/CAI.00063-14>
- Clementi, C. F., Håkansson, A. P., & Murphy, T. F. (2014). Internalization and trafficking of nontypeable *Haemophilus influenzae* in human respiratory epithelial cells and roles of IgA1 proteases for optimal invasion and persistence. *Infection and Immunity*, 82(1), 433–444. <http://doi.org/10.1128/IAI.00864-13>
- De Chiara, M., Hood, D., Muzzi, A., Pickard, D. J., Perkins, T., Pizza, M., ... Donati, C. (2014). Genome sequencing of disease and carriage isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* identifies discrete population structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5439–44. <http://doi.org/10.1073/pnas.1403353111>

- Deknuydt, F., Nordstrom, T., & Riesbeck, K. (2014). Diversion of the host humoral response: a novel virulence mechanism of *Haemophilus influenzae* mediated via outer membrane vesicles. *Journal of Leukocyte Biology*, 95(6), 983–991. <http://doi.org/10.1189/jlb.1013527>
- Dworkin, M. S., & Borchardt, L. P. and S. M. (2007). The changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, especially in persons (greater-than or equal to)65 years old. *Clinical Infectious Diseases*, 44(6), 810–816. <http://doi.org/10.1086/511861>
- Epling, J. (2012). BACTERIAL CONJUNCTIVITIS. *BMJ Publishing Group Ltd*, (July 2011), 1–21.
- Erwin, A. L., & Smith, A. L. (2007). Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends in Microbiology*, 15(8), 355–362. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2007.06.004>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2015). Vaccine-preventable diseases - Invasive bacterial diseases, 2014. *ECDC*, 33.
- Farshid, J., & Riesbeck, K. (2014). *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 13(3), 199–200. <http://doi.org/10.1093/jac/13.3.199>
- Feazel, L. M., Santorico, S. a, Robertson, C. E., Bashraheil, M., Scott, J. A. G., Frank, D. N., & Hammitt, L. L. (2015). Effects of Vaccination with 10-Valent Pneumococcal Non-Typeable *Haemophilus influenzae* Protein D Conjugate Vaccine (PHiD-CV) on the Nasopharyngeal Microbiome of Kenyan Toddlers. *PloS One*, 10(6), e0128064. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0128064>
- Fernanda, R., Brett, A., Januário, G., Marques, J. G., & Gonçalves, M. (2014). Norma para o Diagnóstico e Tratamento da Otite Média Aguda na Idade Pediátrica. *Direção Geral de Saúde*, 1–13.
- Finney, L. J., Ritchie, A., Pollard, E., Johnston, S. L., & Mallia, P. (2014). Lower airway colonization and inflammatory response in COPD: a focus on *Haemophilus influenzae*. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 9, 1119–32. <http://doi.org/10.2147/COPD.S54477>
- Forsgren, A., Riesbeck, K., & Janson, H. (2008). Protein D of *Haemophilus influenzae*: a protective nontypeable H. influenzae antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(5), 726–731. <http://doi.org/10.1086/527396>
- Foxwell, a R., Kyd, J. M., & Cripps, a W. (1998). Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(2), 294–308.



- Gallaher, T. K., Wu, S., Webster, P., & Aguilera, R. (2006). Identification of biofilm proteins in non-typeable *Haemophilus Influenzae*. *BMC Microbiology*, 6, 65. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-6-65>
- Ganesan, S., Comstock, A. T., Kinker, B., Mancuso, P., Beck, J. M., & Sajjan, U. S. (2014). Combined exposure to cigarette smoke and nontypeable *Haemophilus influenzae* drives development of a COPD phenotype in mice. *Respiratory Research*, 15(1), 11. <http://doi.org/10.1186/1465-9921-15-11>
- García-Cobos, S., Campos, J., Lázaro, E., Román, F., Cercenado, E., García-Rey, C., ... De Abajo, F. (2007). Ampicillin-resistant non- $\beta$ -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: Recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7), 2564–2573. <http://doi.org/10.1128/AAC.00354-07>
- García-Cobos, S., Campos, J., Román, F., Carrera, C., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B., & Oteo, J. (2008). Low beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2407–14. <http://doi.org/10.1128/AAC.00214-08>
- Gillespie, S. H., & Hawkey, P. M. (2006). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. (Wiey, Ed.) (2<sup>a</sup> ed.).
- Gilsdorf, J. R., McCrea, K. W., & Marrs, C. F. (1997). Role of pili in *Haemophilus influenzae* adherence and colonization. *Infection and Immunity*, 65(8), 2997–3002. <http://doi.org/10.1203/00006450-199604001-02069>
- GlaxoSmithKline Inc. (2015). Synflorix®. Pneumococcal conjugate vaccine (Non-Typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) protein D, diphtheria or tetanus toxoid conjugates) adsorbed, 1–40. Retrieved from <http://www.gsk.ca/english/docs-pdf/product-monographs/Synflorix.pdf>
- Grijalva, C. G., Leach, A., & Patel, J. (2014). Panel 6 : Vaccines. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 148(4 0). <http://doi.org/10.1177/0194599812466535>.Panel
- Hallström, T., & Riesbeck, K. (2010). *Haemophilus influenzae* and the complement system. *Trends in Microbiology*, 18, 258–265. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2010.03.007>
- Hernando, M., Roma, F., & Pe, M. (2004). Analysis of Invasive *Haemophilus influenzae* Infections after Extensive Vaccination against H . influenzae Type b, 42(2), 524–529. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.2.524>
- Hill, D. J., Toleman, M. a, Evans, D. J., Villullas, S., Alphen, L. Van, & Virji, M. (2001). The variable P5 proteins of typeable and non-typeable haemophilus influenza target human Ceacam1.pdf>. *Molecular Microbiology*, 39, 850–862.

- Hiltke, T. J., Sethi, S., & Murphy, T. F. (2002). Sequence stability of the gene encoding outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae* in the human respiratory tract. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(5), 627–631. <http://doi.org/10.1086/339362>
- King, P. T., Hutchinson, P. E., Johnson, P. D., Holmes, P. W., Freezer, N. J., & Holdsworth, S. R. (2003). Adaptive Immunity to Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167(4), 587–592. <http://doi.org/10.1164/rccm.200207-728OC>
- King, P. T., Ngui, J., Gunawardena, D., Holmes, P. W., Farmer, M. W., & Holdsworth, S. R. (2008). Systemic humoral immunity to non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Clinical & Experimental Immunology*, 153(3), 376–384. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03697.x>
- King, P. T., & Sharma, R. (2015). The Lung Immune Response to Nontypeable *Haemophilus influenzae* (Lung Immunity to NTHi). *Journal of Immunology Research*, 2015, 1–14. <http://doi.org/10.1155/2015/706376>
- Kulkarni, R., Rammersaud, R., Aguilar, J. L., Randis, T. M., Kreindler, J. L., & Ratner, a. J. (2010). Cigarette Smoke Inhibits Airway Epithelial Cell Innate Immune Responses to Bacteria. *Infection and Immunity*, 78(5), 2146–2152. <http://doi.org/10.1128/IAI.01410-09>
- Ladhani, S., Slack, M. P. E., Heath, P. T., von Gottberg, A., Chandra, M., & Ramsay, M. E. (2010). Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996–2006. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3), 455–463. <http://doi.org/10.3201/eid1603.090290>
- Langereis, J. D., de Jonge, M. I., & Weiser, J. N. (2014). Binding of human factor H to outer membrane protein P5 of non-typeable *H aemophilus influenzae* contributes to complement resistance. *Molecular Microbiology*, 94(1), 89–106. <http://doi.org/10.1111/mmi.12741>
- Langereis, J. D., & Jonge, M. I. De. (2015). Invasive Disease Caused by Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1711–1718.
- MacNeil, J. R., Cohn, A. C., Farley, M., Mair, R., Baumbach, J., Bennett, N., ... Messonnier, N. E. (2011). Current epidemiology and trends in invasive haemophilus influenzae disease-United States, 1989-2008. *Clinical Infectious Diseases*, 53(November), 1230–1236. <http://doi.org/10.1093/cid/cir735>
- Mallia, P., Footitt, J., Sotero, R., Jepson, A., Contoli, M., Trujillo-Torralbo, M.-B., ... Johnston, S. L. (2012). Rhinovirus Infection Induces Degradation of Antimicrobial Peptides and Secondary Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(11), 1117–1124. <http://doi.org/10.1164/rccm.201205-0806OC>

- Mandell, L. a., Wunderink, R. G., Anzueto, a., Bartlett, J. G., Campbell, G. D., Dean, N. C., ... Whitney, C. G. (2007). Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clinical Infectious Diseases*, 44(Supplement 2), S27–S72. <http://doi.org/10.1086/511159>
- Marti-Llitas, P., Regueiro, V., Morey, P., Hood, D. W., Saus, C., Saulea, J., ... Garmendia, J. (2009). Nontypeable *Haemophilus influenzae* Clearance by Alveolar Macrophages Is Impaired by Exposure to Cigarette Smoke. *Infection and Immunity*, 77(10), 4232–4242. <http://doi.org/10.1128/IAI.00305-09>
- Michel, L. V., Snyder, J., Schmidt, R., Milillo, J., Grimaldi, K., Kalmeta, B., ... Pichichero, M. E. (2013a). Dual orientation of the outer membrane lipoprotein P6 of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology*, 195(14), 3252–3259. <http://doi.org/10.1128/JB.00185-13>
- Michel, L. V., Snyder, J., Schmidt, R., Milillo, J., Grimaldi, K., Kalmeta, B., ... Pichichero, M. E. (2013b). Dual Orientation of the Outer Membrane Lipoprotein P6 of Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology*, 195(14), 3252–3259. <http://doi.org/10.1128/JB.00185-13>
- Mizrahi, A., Cohen, R., Varon, E., Bonacorsi, S., Bechet, S., Poyart, C., ... Raymond, J. (2014). Non typable-*Haemophilus influenzae* biofilm formation and acute otitis media. *BMC Infectious Diseases*, 14(1), 400. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-14-400>
- Monteiro, M. E., Santos, I., Caetano, P., Pinto, D., & Heleno, B. (2011). Orientação n.º 045/2011: Antibioterapia na Pneumonia Adquirida na Comunidade em Adultos Imunocompetentes. *Direcção-Geral Saúde*, 1–17.
- Morey, P., Viadas, C., Euba, B., Hood, D. W., Barberán, M., Gil, C., ... Garmendia, J. (2013). Relative contributions of lipooligosaccharide inner and outer core modifications to nontypeable *haemophilus influenzae* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 81(11), 4100–4111. <http://doi.org/10.1128/IAI.00492-13>
- Moxon, E. R., Rainey, P. B., Nowak, M. A., & E. Lenski, R. (1994). Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biology*, 4, 24–33.
- Murphy, T. F. (2015). Vaccines for Nontypeable *Haemophilus influenzae*: the Future Is Now. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 22(5), 459–466. <http://doi.org/10.1128/CVI.00089-15>
- Murphy, T. F., & Kirkham, C. (2002). Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiology*, 2, 7. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-2-7>
- Murray, Rosenthal, & Pfaller. (2014). *Microbiologia Médica* (7ª ed.). Elsevier Ltd.

- Naushad, S., Adeolu, M., Goel, N., Khadka, B., Al-dahwi, A., & Gupta, R. S. (2015). Phylogenomic and Molecular Demarcation of the Core Members of the Polyphyletic Pasteurellaceae Genera. *International Journal of Genomics*, 2015.
- Ostberg, K., Russell, M., & Murphy, T. (2015). Mucosal immunization of mice with recombinant OMP P2 induces antibodies that bind to surface epitopes of multiple strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Mucosal Immunol*, 2(1), 63–73. <http://doi.org/10.1038/mi.2008.70.Mucosal>
- Paula Lavado. (2009). EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR HAEMOPHILUS INFLUENZAE APÓS INTRODUÇÃO DA VACINA HIB NO PLANO NACIONAL DE VACINAÇÃO. Retrieved October 22, 2015, from <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ID/Paginas/HinfluenzaevacinaHibPNV.a.spx>
- Puig, C., Calatayud, L., Martí, S., Tubau, F., Garcia-Vidal, C., Carratalà, J., ... Ardanuy, C. (2013). Molecular epidemiology of nontypeable *haemophilus influenzae* causing community-acquired pneumonia in adults. *PLoS ONE*, 8(12), 6–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0082515>
- Puig, C., Grau, I., Marti, S., Tubau, F., Calatayud, L., Pallares, R., ... Ardanuy, C. (2014). Clinical and Molecular Epidemiology of *Haemophilus influenzae* Causing Invasive Disease in Adult Patients. *PLoS ONE*, 9(11), e112711. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0112711>
- Rahman, N. A. (2009). Comparison of Virulence Determinants of Different Strains of *Haemophilus influenzae* . *Heratonline.com*, (Figure 1).
- Ranganathan, V. (2014). Biofilms : Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(3), 1–16. <http://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00014>
- Reidl, J., Schlör, S., Kraiß, A., Schmidt-Brauns, J., Kemmer, G., & Soleva, E. (2000). NADP and NAD utilization in *Haemophilus influenzae*. *Molecular Microbiology*, 35(6), 1573–1581. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01829.x>
- Ronander, E., Brant, M., Eriksson, E., Mörgelin, M., Hallgren, O., Westergren-Thorsson, G., ... Riesbeck, K. (2009). Nontypeable *Haemophilus influenzae* Adhesin Protein E: Characterization and Biological Activity. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(4), 522–531. <http://doi.org/10.1086/596211>
- Rosadini, C. V., Ram, S., & Akerleya, B. J. (2014). Outer membrane protein p5 is required for resistance of nontypeable *haemophilus influenzae* to both the classical and alternative complement pathways. *Infection and Immunity*, 82(2), 640–649. <http://doi.org/10.1128/IAI.01224-13>

- Rosenfeld, R. M., Piccirillo, J. F., Chandrasekhar, S. S., Brook, I., Ashok Kumar, K., Kramper, M., ... Corrigan, M. D. (2015). Clinical Practice Guideline (Update): Adult Sinusitis. *Otolaryngology -- Head and Neck Surgery*, 152(2 Suppl), S1–S39. <http://doi.org/10.1177/0194599815572097>
- Schuchat, A., & Messonnier, N. R. (2007). From pandemic suspect to the postvaccine era: the *Haemophilus influenzae* story. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 44(6), 817–819. <http://doi.org/10.1086/511886>
- Sharma, S. K., & Pichichero, M. E. (2014). Cellular Immune Response in Young Children Accounts for Recurrent Acute Otitis Media. *Curr Allergy Asthma Rep*, 13(5), 1–11. <http://doi.org/10.1007/s11882-013-0370-z>.Cellular
- Smith-Vaughan, H. C., Chang, A. B., Sarovich, D. S., Marsh, R. L., Grimwood, K., Leach, A. J., ... Price, E. P. (2014). Absence of an important vaccine and diagnostic target in carriageand disease-related nontypeable *haemophilus influenzae*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(2), 250–252. <http://doi.org/10.1128/CVI.00632-13>
- Spahich, N. A., Kenjale, R., McCann, J., Meng, G., Ohashi, T., Erickson, H. P., & Geme, J. W. St. (2014). Structural determinants of the interaction between the *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter and fibronectin. *Society for General Microbiology Journals*, 160, 1182–1190. <http://doi.org/10.1099/mic.0.077784-0>
- Spahich, N. a., & St. Geme, J. W. (2011). Structure and Function of the *Haemophilus influenzae* Autotransporters. *Frontiers in Microbiology*, 2(September), 1–9. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00196>
- Swords, W. E. (2012). Nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms: role in chronic airway infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(July), 1–5. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00097>
- Taubenberger, J. K., Hultin, J. V., & Morens, D. M. (2007). Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context. *Antiviral Therapy*, 12(4 B), 581–591.
- Tristram, S., Jacobs, M. R., & Appelbaum, P. C. (2007). Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 368–389. <http://doi.org/10.1128/CMR.00040-06>
- Ulanova, M., & Tsang, R. S. W. (2009). Infection , Genetics and Evolution Invasive *Haemophilus influenzae* disease : Changing epidemiology and host – parasite interactions in the 21st century, 9, 594–605. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.03.001>
- Van Eldere, J., Slack, M. P. E., Ladhani, S., & Cripps, A. W. (2014). Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen. *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(14), 1–12. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70734-0](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70734-0)

- Vidya R Devarajan, M. (2015). Haemophilus Influenzae Infections Treatment & Management. Retrieved October 19, 2015, from <http://emedicine.medscape.com/article/218271-treatment>
- Wallace, R. J., Baker, C., Quinones, F., Hollis, D., Weaver, R., & Wiss, K. (1983). Non TitleNontypable hemophilus-influenzae (biotype-4) as a neonatal, maternal, and genital pathogen. *Reviews of Infectious Diseases*, 5(1), 123–136.
- Witherden, E. a, Montgomery, J., Henderson, B., & Tristram, S. G. (2011). Prevalence and genotypic characteristics of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant Haemophilus influenzae in Australia. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(5), 1013–5. <http://doi.org/10.1093/jac/dkr035>
- Zakharian, E., & Reusch, R. N. (2007). Haemophilus influenzae Outer Membrane Protein P5 Is Associated with Inorganic Polyphosphate and Polyhydroxybutyrate. *Biophysical Journal*, 92(2), 588–593. <http://doi.org/10.1529/biophysj.106.095273>